

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität
Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Untersuchungen über die Reaktion von
Pyridin-, Piperidin-, Piperazin-, Phenazin-,
Phenthiazin-, Chinolin- und Acridinverbindungen
mit der NAD(P) Glycohydrolase
Ein Beitrag zur enzymatischen Synthese
von NAD(P) Analogen.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Ahmed Schabarek
aus Aleppo

1967
—

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität

Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Hans Herken

Untersuchungen über die Reaktion von
Pyridin-, Piperidin-, Piperazin-, Phenazin-,
Phenthiazin-, Chinolin- und Acridinverbindungen
mit der NAD(P) Glycohydrolase
Ein Beitrag zur enzymatischen Synthese
von NAD(P) Analogen.

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Ahmed Schabarek
aus Aleppo
1967

1. Referent: Professor Dr. G. S c h e n c k

2. Referent: Professor Dr. H. H e r k e n

Tag der mündlichen Prüfung: 21.6.1967

Tag der Promotion:

13. Juli 1967



Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. <u>Einleitung</u>	1
II. <u>Methoden</u>	4
A. Herstellung der Glycohydrolase-präparate	4
B. Reaktionsansatz	6
C. Ionenaustauschchromatographie	6
D. Gefriertrocknung	7
E. Papierchromatographie	7
F. Identifizierung der Nucleotide	8
1) Aufzeichnung der UV-Spektren	8
2) Phosphat und Ribose Bestimmungen	8
3) Hydrolyse	10
4) Isotopenmessung	11
G. Bildung von NAD(P) Analogen in vivo	12
III. <u>Ergebnisse</u>	13
A. Pyridin Verbindungen	13
1) 5-Fluornikotinamid	13
2) Nikethamid (Nikotinsäurediäthylamid)	18
3) Nikotin	22
4) Isonikotinsäureamid	24
5) Isonikotinsäure	25
6) 6-Hydroxynikotinamid	25
B. Chinolin Verbindungen	26
1) 5-Aminochinolin	26
2) 8-Aminochinolin	29
3) 5-Nitro-8-hydroxychinolin	30
C. Acridin, Phenazin, Phentiazin-Verbindungen sowie Piperidin und Piperazin	30
D. Identifizierung der synthetisierten Nucleo- tide	32
1) Phosphat und Ribose Bestimmungen	32
2) Hydrolyse	36
IV. <u>Diskussion</u>	48
V. <u>Zusammenfassung</u>	53
VI. <u>Literatur</u>	54
<u>Abkürzungen</u>	60

I. E I N L E I T U N G

Im Jahre 1953 haben K a p l a n und Mitarbeiter (59) gefunden, dass die NAD(P) Nucleosidase (NAD(P)-Glycohydrolase E.C.3.2.2.6.) die Pyridinnucleotide nicht nur hydrolytisch spaltet, sondern auch den Austausch von freiem und im NAD(P) gebundenen Nikotinamid katalysiert.

Ein derartiger Austausch liess sich auch mit Isonikotinsäurehydrazid (60) oder 3-Acetylpyridin (35, 36), die dem Nikotinamid strukturähnlich sind, nachweisen.

Die auf diese Weise sich bildenden abnorm strukturierten Pyridinnucleotide können mitunter mit dem gleichen Rezeptor wie die natürlichen Verbindungen reagieren, ohne deren Funktion zu übernehmen (7, 25, 27).

H e r k e n und Mitarbeiter (15, 16) stellten fest, dass die Applikation von 3-Acetylpyridin bei Ratten schwere zentralnervöse Funktionsstörungen hervorruft, die monatelang anhalten und sich als Störungen des Bewegungsrhythmus äussern. In den Gehirnen der vergifteten Tiere liess sich 3-Acetylpyridin-AD(P) nachweisen. Dabei fiel auf, dass relativ viel mehr 3-Acetylpyridin-ADP als 3-Acetylpyridin-AD gebildet wird. Der Anteil an 3-Acetylpyridin-ADP betrug bis zu 50% des natürlichen Coenzym.

Die Wirkung der Pyridinnucleotide in der Zelle beruht auf der Fähigkeit des Pyridinanteils, zwei Wasserstoffatome zu addieren und diese wieder abzugeben (57).

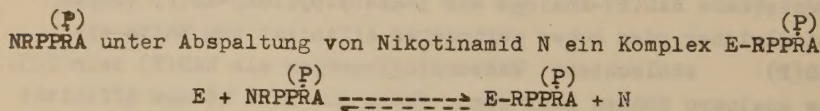
Hydrierbare NAD(P)-Analoge wie 3-Acetylpyridin-AD(P) können bei gleicher oder sogar geringerer Affinität zum Enzym wie NAD(P) schlechtere Wasserstoffcarrier als NAD(P) sein (25). Die Analogen können aber auch, falls sie eine höhere Affinität als NAD(P) zum Rezeptor besitzen, als echte Hemmstoffe der entsprechenden Reaktion wirken. Eine solche Hemmung ist auch bei den Analogen denkbar, die selbst nicht mehr als Wasserstoffüberträger wirken können. Wenn z. B. das Nikotinamid des NAD(P) durch Verbindungen ersetzt wird, die an Position 4 des Pyridinringes substituiert sind, so werden diese NAD(P)-Analoge

nicht mehr als Cofaktoren wasserstoffübertragender Enzyme wirksam sein können, da gerade in dieser Position die Wasserstoffübertragung stattfindet (49). Auch das an Position 6 mit einer Aminogruppe substituierte Pyridinnucleotid ist nicht mehr hydrierbar. 6-ANAD(P) ist Hemmstoff verschiedener Dehydrogenasen (24, 56).

Inzwischen sind mit Hilfe der Nucleosidase, wenn auch meist nur in vitro, eine grosse Zahl von Verbindungen zu NAD(P) Analogen synthetisiert worden (4, 5, 6, 7, 13, 14, 15, 19, 24, 29, 30, 36, 37, 54, 56, 60). Dabei stellte sich heraus, dass die zu transferierenden Substanzen mit dem Vitamin nicht einmal strukturverwandt sein müssen. A l i v i s a t o s und Mitarbeiter (3, 4, 5, 6) haben die Dinucleotide von Imidazol-Verbindungen und K a p l a n und Mitarbeiter von Thiazolen (19) hergestellt. Ob alle diese NAD(P)-Analogen auch in vivo in den Zellen gebildet werden, ist bisher kaum untersucht. Unabhängig davon ist es wichtig, in systematischen Untersuchungen festzustellen, welche Verbindungen prinzipiell gegen das Nikotinamid im NAD(P) ausgetauscht werden können, um vielleicht später voraussagen zu können, ob Störungen im Organismus möglicherweise auf die Bildung von NAD(P)-Analogen zurückzuführen sind.

Nach den Vorstellungen von K a p l a n und Mitarbeiter (28, 38) arbeitet die Nucleosidase nach folgendem Prinzip:

Zunächst bildet sich zwischen der Nucleosidase E und dem Substrat



Durch Erhöhung der Konzentration an freiem NA wird die Reaktion in Richtung der Synthese von NAD(P) verschoben.

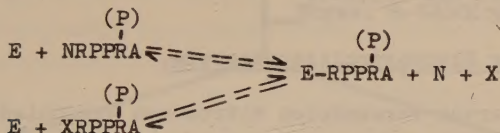
Dabei kann wie erwähnt das freie NA gegen das im NAD(P) gebundene ausgetauscht werden (50).

Wird die Nikotinamid-Konzentration verringert, so verschiebt sich das Gleichgewicht nach rechts, der Adenosindiphosphat-ribose(Phosphat)-Komplex reagiert mit Wasser, und es

entsteht in einer irreversiblen Reaktion freies Adenosindiphosphat(Phosphat).



Enthält der Reaktionsansatz neben oder statt NA einen Antimetaboliten des NA, so kann unter bestimmten Bedingungen nicht nur das Vitamin, sondern auch das Antivitamin (X) mit dem Enzymkomplex reagieren, wobei NAD(P)-Analoge entstehen.



Welche Analogen gebildet werden und welches Ausmass die Synthese erreicht, hängt von der NA Konzentration, dem PH Wert, bei dem die Reaktion stattfindet, von der Konzentration des Antagonisten, seiner Affinität zum Enzymkomplex, von der Stabilität der Analogen gegenüber der enzymatischen Hydrolyse und sicher noch weiteren bisher unbekannten Faktoren ab (11,12).

In der vorliegenden Arbeit wurden einige pharmakologisch aktive Substanzen, im Hinblick auf ihre Fähigkeit NAD(P) Analogen zu bilden, untersucht.

Ausgewählt wurden von Pyridinverbindungen das bakterio- statisch und carcinostatisch wirksame 5-Fluornikotinamid, (53) das Analeptikum Nikethamid (Nikotinsäurediäthylamid=Coramin) (55), Nikotin, Isonikotinsäure und Isonikotinsäureamid. Ausserdem wurde geprüft, ob auch Verbindungen vom Typ der chemo- therapeutisch wirksamen Chinoline (5-Aminochinolin, 8-Amino- chinolin und 5-Nitro-8-hydroxychinolin (51).) oder Verbindungen vom Typ der Acridine (Proflavin, Acridin. und Acridinorange) oder Phenazine (Safranin) oder Phenthiazin (Methylenblau) gegen das Nikotinamid des NAD(P) austauschbar sind.

Schliesslich wurden auch das als Wurmmittel verwendete Piperazin und Piperidin als Reaktionspartner der Glycohydrolase eingesetzt.

II. M E T H O D E N

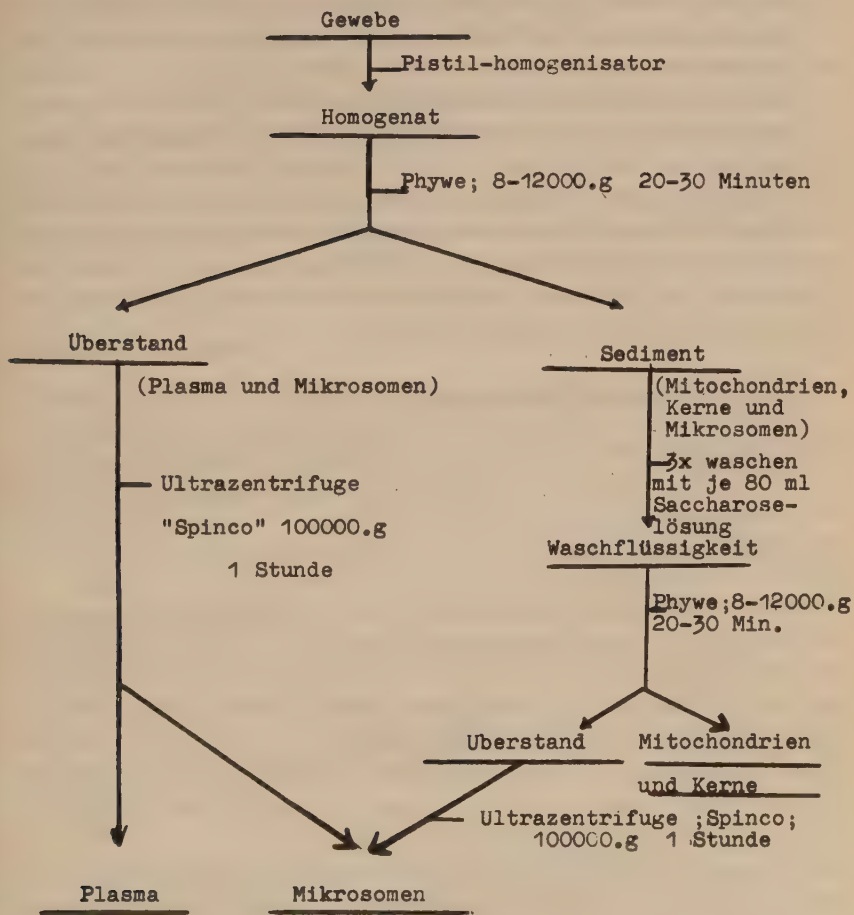
Auf Grund der in Arbeiten von B r u n n e m a n n und C o p e r (11,12) gemachten Erfahrungen wurde eine Standardmethode entwickelt und geprüft, ob unter diesen Bedingungen die Transferierung der untersuchten Substanzen erfolgt. Als Substrat der Nucleosidase wurde in der Regel NADP verwendet, weil mit NADP die Austauschreaktion wesentlich besser abläuft als mit NAD (15,16).

A. Herstellung der Glycohydrolasepräparate.

Die als Enzympräparate verwendeten Mikrosomen verschiedener Gewebe wurden nach Homogenisieren der Organe nach den Angaben von C o p e r, H e l g e und H e r k e n (23) gewonnen.

Es wurde vorwiegend Gehirn oder Milz von Ratten im Gewicht von 150-200 g aufgearbeitet. Die Trennung der Zellfraktionen erfolgte in eiskalter 0,25 molarer Saccharoselösung nach dem folgenden Schema:

Schema für die Fraktionierung von Zellbestandteilen



B. Reaktionsansatz

Wenn im Text nicht ausdrücklich anders angegeben, wurde folgender Reaktionsansatz gewählt:

1. NAD bzw. NAD(P) gelöst in $m/15$ Phosphatpuffer von PH 6,6. Endkonzentration der Lösung $5 \cdot 10^{-3}$ molar.
2. Antimetabolit 10^{-1} molar.
3. $1-2 \text{ mg}$ Mikrosomenprotein/ml Reaktionsansatz.
4. Einwirkungszeit der Nucleosidase 4 Stunden bei einer Temperatur von 37°C .

Durch Erhitzen des Reaktionsgemisches für 1 Minute bei 100°C im Wasserbad wurde das Protein der Inkubationslösung ausgefällt, und nach dem Abkühlen abzentrifugiert.

Die Nucleotide im klaren Überstand wurden anschliessend durch Ionenaustauschchromatographie getrennt.

C. Ionenaustauschchromatographie

Zur Anwendung kam die von C o h n (20), C o h n und C a r t e r (21) entwickelte und von H u r l b e r t, S c h m i t z, B r u m m und P o t t e r (33) sowie K o r a n s k y (40) modifizierte Methode der Ionenaustauschchromatographie.

In eine Glassäule von 2 cm Durchmesser wurde der in Wasser suspendierte Anionenaustauscher Dowex 1x10 Formiat Form ca 15 cm hoch gefüllt und darauf die im Überstand gelösten Substanzen aufgetragen.

NA und die meisten der verwendeten basischen Verbindungen werden vom Austauscher nicht festgehalten.

Nach Einsickern des Reaktionsgemisches können sie daher quantitativ durch Waschen mit Wasser schon vor Beginn der eigentlichen Chromatographie entfernt werden.

Der Waschvorgang gilt als beendet, wenn der Messwert des Durchlaufes annähernd den Extinktionswert der Lösungsmittel (Wasser) erreicht hat.

Die Trennung der am Austauscher fest haftenden Stoffe erfolgt durch Gradientenelution mit HCOOH .

Aus einem Vorratsgefäß wurde 4n Ameisensäure über einen mit Wasser gefüllten und mit Magnetrührer versehenen Mischer auf

den Austauscher geleitet, wobei die Ameisensäurekonzentration kontinuierlich ansteigt.

Paraffin diente als Übertragungsmedium von dem Kolben des Druckzylinders auf die Elutionsflüssigkeit.

Die Durchlaufgeschwindigkeit konnte durch Beschweren der Kolbenplatte mit Metallstäben verschiedenen Gewichts reguliert werden. Mit Hilfe eines Fraktionssammlers wurden jeweils 5 ml Elutionsflüssigkeit getrennt aufgefangen und spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 m μ gemessen und die Konzentration der UV absorbierenden Stoffe in ein Koordinatensystem eingetragen. Die zu einer Bande gehörenden Eluate wurden vereinigt und die Extinktion des Gesamtvolumens der getrennten Banden bei 260 m μ bestimmt.

D. Gefriertrocknung

Um Substanzverluste beim Absublimieren der Lösungsmittel zu vermeiden, setzt man 1-2 Tropfen Glycerin zum Lösungsmittel zu. Nach Einfrieren wird die Flüssigkeit unter Vakuum bei -20°C ohne Substanzverlust entfernt.

Der Rückstand wird in wenig Flüssigkeit (meistens Wasser) gelöst und zur weiteren Analyse durch Alkoholfällung gereinigt.

E. Papierchromatographie

Um eine gute Trennung sowie Reinigung der bei der Gefriertrocknung durch Absublimieren der Elutionsflüssigkeit gewonnenen Substanzen zu erzielen, wurden die mit Wasser aufgenommenen Verbindungen auf Whatman-papier (30x32 cm) Nr. 1 rechromatographiert.

Als Lösungsmittel dienten folgende Gemische:

1. Isobuttersäure, Wasser, Ammoniak im Verhältnis 66:33:1
2. n-Propanol, Ammoniak, Wasser im Verhältnis 60:30:10.

Mit einer Glaspipette, der ein dünnes Kunststoff-röhrchen angeschlossen war, wurde die Substanz auf die etwa 3 cm von dem unteren Rand entfernte Startlinie aufgetragen.

Um eine gute Trennung zu erhalten, erwies es sich als zweckmässig, auf 1 cm Papier die Menge aufzutragen, die einer Extinktion von 1,0 bei 260 m μ entspricht.

Die Laufzeit betrug 16 Stunden aufsteigend, wobei unter einer zylindrischen Glasglocke chromatographiert wurde.

Unter diesen Bedingungen trennen sich NAD(P), seine Analogen und eventuell noch vorhandene Reste der freien Basen meist gut voneinander ab. Das Papier wurde an der Luft getrocknet und die einzelnen Komponenten mit Hilfe von JV-Licht markiert.

Zur Dokumentation der Ergebnisse der Papierchromatographie wurden die UV-Licht absorbierenden Flecken mit dem Photoprintverfahren nach Markham und Smith (46) fotografiert, anschliessend aus dem Papier geschnitten und mit Wasser, ohne Papierteilchen mitzureissen vorsichtig eluiert. Dazu hängt man die Papierstreifen unter einer Glocke in ein wasserhaltiges Eluiergefäss, wobei das Wasser langsam die Papierstreifen herabläuft und von der Spitze in ein Auffanggefäss abtropft.

F. Identifizierung der Nucleotide

1. Aufzeichnen der UV-Spektren

Von den so gewonnenen reinen Substanzen wurden die UV-Spektren im neutralen, (PH=7) sauren, (PH=1) und alkalischen Milieu (PH=14) zwischen 220 und 400 m μ mit einem Beckman-Spektrophotometer Modell Dk 2 aufgenommen.

Zum Vergleich wurden die UV-Spektren der eingesetzten Basen und von NAD(P) unter denselben Bedingungen aufgezeichnet.

2. Phosphat- und Ribose-Bestimmungen

a. Kolorimetrische Bestimmung des Phosphatanteils

Die Bestimmung des Phosphatgehaltes der zu analysierenden Verbindungen wurde nach der Methode von Berenblum und Chai (10) durchgeführt.

Das Verfahren basiert auf der vollständigen Extrahierbarkeit der Phosphormolybdänsäure mit Isobutanol.

Zunächst wird der organisch gebundene Phosphor in die anorganische Form durch Veraschen mit 1 ml 12N Perchlorsäure bei 180°C überführt. Das klare farblose Veraschungsprodukt wird dann in einen kleinen Scheidetrichter gespült und nach Zugabe

von 2,5 ml 5%iger Ammoniummolybdatlösung mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt und mit 10 ml Isobutanol versetzt. Nach 2 Minuten langem Schütteln wird die wässrige Phase abgelassen, und die das Phosphat enthaltene zurückbleibende alkoholische Phase 2 mal mit je 5 ml 1n Schwefelsäure gewaschen.

Schliesslich wird durch 30 Sekunden langes Schütteln mit 15 ml verdünnter Zinn-2-chloridlösung die Phosphormolybdänsäure zu einer blauen Komplexverbindung reduziert.

Die zu jeder Bestimmung frisch mit konzentrierter Salzsäure bereitete 40%ige Zinn-2-chloridlösung ist mit 1n Schwefelsäure im Verhältnis 1:200 verdünnt.

Die wässrige Phase wird erneut abgelassen und die blaugefärbten Lösungen quantitativ in Messkolben mit Äthanol gespült und mit Äthanol auf 25 ml aufgefüllt.

Als Eichwert diente eine Lösung von primärem Kaliumphosphat (KH_2PO_4) mit einem Phosphatgehalt von $1\mu\text{ Mol/ml}$.

Die Extinktion der Lösungen wurde in einem Beckman-Spektrophotometer Modell DU bei $725\text{ m}\mu$ gemessen.

b. Kolorimetrische Bestimmung des Riboseanteils

Die Ribose Bestimmung erfolgte nach der von M e j b a u m (42) angegebenen und von B a r n u m und Mitarbeiter (9) modifizierten Methode. Dazu benötigt man eine Orcinlösung folgender Zusammensetzung:

Orcin 0,4g

Eisentrichlorid Lösung 1,0 ml (4%ig)

Salzsäure ad 100 (36%ig)

1 ml der Ribose enthaltenden Lösung und 2 ml des Orcin Reagenz wurden 15 Minuten im kochenden Wasserbad ernitzt, wobei sich die Lösung bei Anwesenheit von Ribose grün verfärbt. Die Intensität der grünen Farbe wurde nach dem Abkühlen der Lösung bei einer Wellenlänge von $668\text{ m}\mu$ gegen einen Leerwert (Wasser) in einem Beckman-Spektrophotometer gemessen.

Als Eichwert dienten zwei Lösungen mit je einer definierten Menge von NAD(P) und AMP, deren spezifische Extinktion bei einer Wellenlänge von $260\text{ m}\mu$ bekannt ist.

Ribosebestimmung mit Natriumperjodat

Die Methode beruht darauf, dass das Perjodat mit der Ribose durch Oxydation der OH-Gruppen reagiert und dadurch die UV-Absorption des Oxydationsmittels abnimmt (43).

Aus der Abnahme der Extinktion bei 225 m μ lässt sich die oxydierte Ribosemenge errechnen.

Die Konzentration der Perjodatlösung muss im Vergleich zum geschätzten Ribosegehalt (NAD von 1,0 E₂₆₀/ml = $1,1 \cdot 10^{-7}$ Mol/ml) im Überschuss vorhanden sein und betrug in den eigenen Versuchen $2 \cdot 10^{-7}$ Mol/ml.

In 3 Reagenzgläsern a, b und c wurden folgende Mischungen je zu 3 ml angesetzt.

	a	b	c
Probe	1 ml	0	1 ml
NaJO ₄	0	1 ml	1 ml
H ₂ O	2 ml	2 ml	1 ml

Durch wiederholte Messung der Extinktion bei 225 m μ in a, b und c in bestimmten Zeitabständen kann man den Perjodatverbrauch durch die Extinktionsabnahme in c verfolgen.

Die Reaktion gilt als beendet, wenn die Extinktion in c konstant bleibt. Der Perjodatverbrauch bzw. der Ribosegehalt wird durch Subtrahieren des Wertes c von der Summe der Mittelwerte a und b ermittelt.

3. Hydrolyse

Wässrige Hydrolyse

Da sich weder aus den UV-Spektren noch dem Ribose- und Phosphatanteil eines Nucleotids die Identität seiner Base ergibt, war es notwendig nachzuweisen, dass aus den synthetisierten NAD(P)

Analogen tatsächlich auch der primär eingesetzte Antimetabolit wieder abzutrennen ist. Bei mehrstündigem Erhitzen einer wässrigen NAD-Lösung im kochenden Wasserbad wird NAD quantitativ in Nikotinsäureamid und Adenosindiphosphat-ribose (ARPPR) gespalten. Deshalb wurde versucht, auch die Di- bzw. Trinucleotide des 5-Fluornikotinamids, des Nikethamids, des Nikotins, des Isonikotinsäureamids, des 5-Aminochinolins und des 8-Aminochinolins in gleicher Weise zu hydrolysieren.

Die Lösung wurde nach der Hydrolyse fast bis zur Trockene eingeengt und gegen entsprechende Vergleichssubstanzen auf Whatman-papier Nr. 1 aufgetragen und mit einem geeigneten Lösungsmittelgemisch getrennt.

Durch Vergleich der Rf-Werte lässt sich eine gewisse Identifizierung erreichen. Doch wurden zusätzlich die den Basen entsprechenden UV absorbierenden Flecken mit gleich grossen Papier-arealen als Leerwert ausgeschnitten, mit Wasser eluiert und die UV Spektren der so gewonnenen Substanzen mit Hilfe eines Beckman-Spektralphotometers Modell DK 2 im neutralen, (PH=7) sauren (PH=1) und alkalischen Milieu (PH=14) aufgenommen.

Zum Vergleich dienten die UV-Spektren der Original-Substanzen.

Saure Hydrolyse

Wie sich im Laufe der Untersuchungen herausstellte, sind manche NAD(P) Analogen gegen wässrige Hydrolyse stabiler als NAD(P). Um eine vollständige Spaltung dieser Verbindungen zu erreichen, hat es sich bewährt, die Hydrolyse 60 Minuten in 0,1n Salzsäure bei 120°C in eingeschmolzenen Glasröhrchen durchzuführen.

Dabei werden die Nucleotide in die zwei UV absorbierenden Anteile-Adenin und Pyridin oder Chinolin-Verbindung-gespalten, die dann, jede für sich, in Relation zu einander bestimmt werden können.

4. Isotopenmessung

Bei den Versuchen mit Nikethamid konnte die Analyse der Analogen durch Verwendung eines Tritium markierten Nikethamids ergänzt werden. Zur Messung der Radioaktivität wurde eine definierte Menge (0,1 ml) des in Wasser gelösten vermeintlichen Nikethamid Analogen des NAD(P) in ein Spezialgläschen gegeben, das mit 2 ml Äthanol und 8 ml eines Gemisches aus 1,4-bis-2 (4-Methyl-5-Phenylloxazolyl)-Benzen = (POPOP/Packard), 2,5-Diphenylloxazol = (PPO/Packard) und Toluol beschickt worden war.

Aus der Zählung der Impulse liess sich durch Titration gegen

eine Standardlösung von definierter Zerfallsrate die Menge an radioaktiver Substanz ermitteln und mit den anderen Analyseergebnissen in Beziehung setzen.

Zur Messung der Radioaktivität diente ein "Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Counting System" Modell 314 EX, das die Impulse pro Minute angibt.

G. Bildung von NAD(P)-Analogen in vivo

Ratten im Gewicht von 120-140 g erhielten 250 mg/Kg 5-Fluornikotinamid bzw. 5-Aminochinolin oder 8-Aminochinolin intraperitoneal. 16 Stunden später wurden die Tiere dekapitiert und ihre Lebern so schnell wie möglich in flüssiger Luft eingefroren. Die Lebern wurden gewogen und mit der gleichen Gewichtsmenge gefrorener 4%iger Perchlorsäure zerrieben.

Während des Zentrifugierens für 30 Minuten bei 12000 Umdrehungen/Min. taut das homogene Pulver auf.

Die überstehende, gelblich gefärbte, aber klare Flüssigkeit wurde unter Zusetzen von 0,2 molarer Tris-Pufferlösung von PH 7,5 mit 2n KOH auf PH 7,4 neutralisiert und das im Eisbad ausgefallene KClO_4 abzentrifugiert.

Die überstehenden Extrakte wurden auf den Austauscher gebracht und, wie unter Methoden in den Abschnitten C, D und E beschrieben ist, weiter behandelt.

III. E R G E B N I S S E

A. Bildung von NAD(P)-Analogen in vitro durch enzymatischen Austausch von Nikotinsäureamid gegen andere Pyridinverbindungen.

Die Identifizierung der einzelnen in vitro synthetisierten Verbindungen wurden nach dem folgenden Schema durchgeführt:

- 1) Austausch Reaktion
- 2) Isolierung der Substanzen durch Ionenaustauschchromatographie.
- 3) Weitere Auftrennung und Reinigung durch Papierchromatographie.
- 4) Aufnahme der UV-Spektren.
- 5) Phosphat und Ribose Bestimmung.
- 6) Hydrolyse.

In den folgenden Abschnitten sind jedoch diese einzelnen Schritte für die verschiedenen Verbindungen zusammengefasst dargestellt. Dadurch werden die in den Abbildungen vorkommenden Bezeichnungen der Substanzen dem später festgestellten Gesamtergebnis vorweggenommen.

1. Einbau von 5-Fluornikotinamid in NADP.

Isolierung von 5-Fluornikotinamid-ADP

Nach 4-stündiger Inkubation von $0,13 \cdot 10^{-3}$ Mol NADP, $2,4 \cdot 10^{-3}$ Mol 5-Fluornikotinamid gelöst in 20,6 ml m/15 Phosphatpuffer von PH 6,6 und Ratten bzw. Schweinegehirn-mikrosomen (4,4 ml Enzymproteinsuspension = 1,152mg/ml N) wurde die Ionenaustauschchromatographie dieses Reaktionsansatzes vorgenommen.

Abb. (1) zeigt, dass bei dem unter Methoden beschriebenen Verfahren mit 4n Ameisensäure nur eine einheitlich erscheinende Bande eluiert wird.

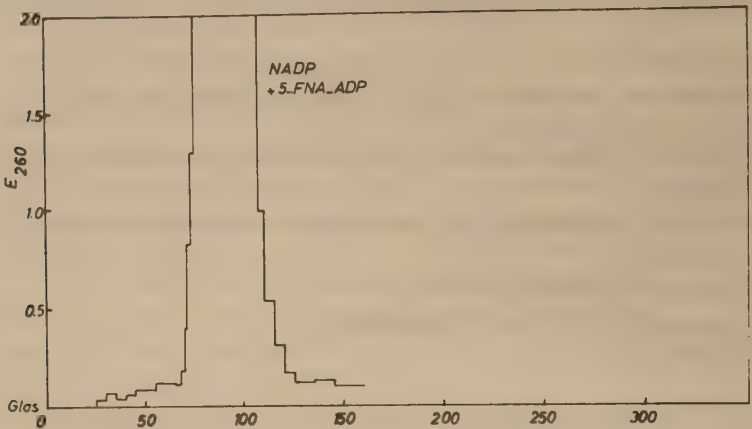


Abb. (1): Ionenaustauschchromatographie der Reaktionsprodukte von NADP und 5-Fluornikotinamid nach Einwirkung der Glycohydrolase aus Gehirnmikrosomen. Austauscher: Dowex 1x10 Formiat Form. Eluiert mit 4n Ameisensäure.

Die in ihr befindlichen Nucleotide (Glas 66-130) wurden durch Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit und durch Papierchromatographie weiter getrennt. Dabei teilte sich die zunächst einheitlich erscheinende Bande in zwei dicht aufeinander folgende, dennoch deutlich voneinander abtrennbare Fraktionen. Abb.(2)

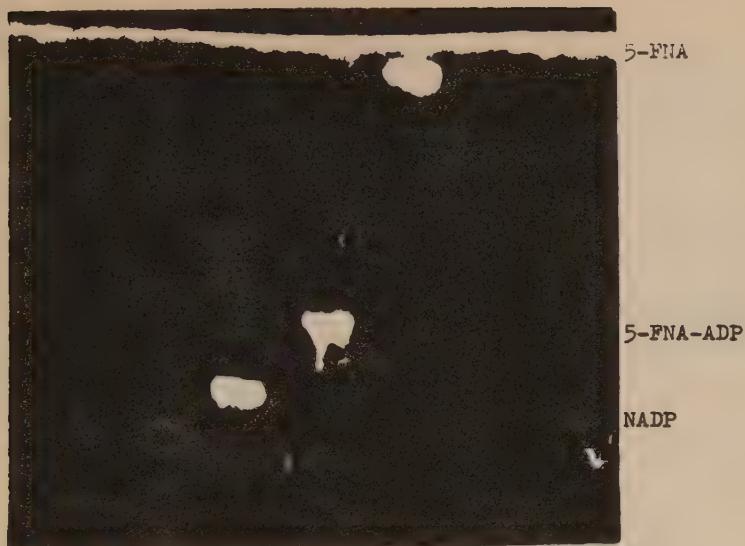
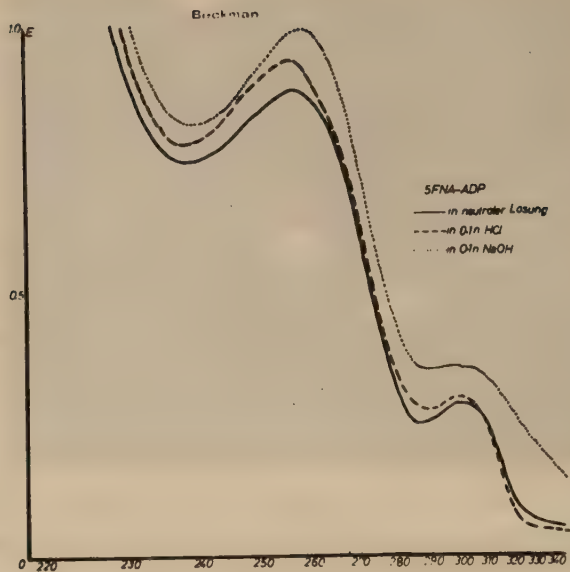


Abb.(2): Papierchromatographische Trennung von NADP, 5-Fluor-nikotinamid-ADP und 5-Fluornikotinamid.

Lösungsmittelgemisch: Isobuttersäure/Ammoniak/Wasser. 66:1:33

Die Verbindung mit dem grösseren Rf Wert Abb.(2) hat im neutralen, sauren und alkalischen Milieu neben einem Absorptionsmaximum bei 258 m μ ein zweites Maximum bei 300 m μ Abb.(3)

Abb. (3)



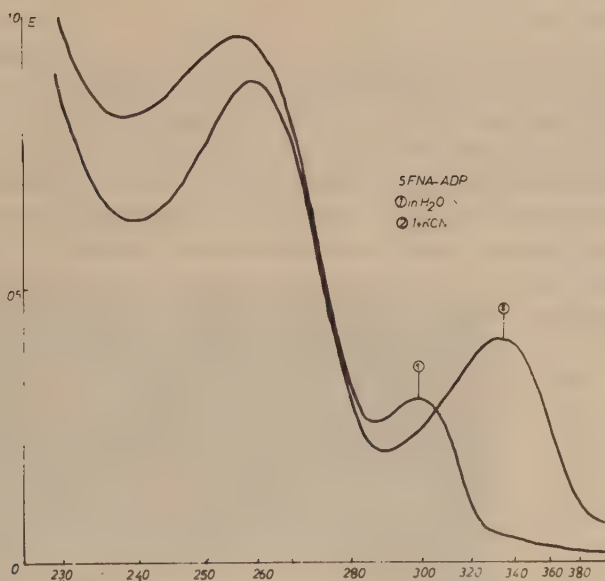
Die Bande mit dem geringeren Rf Wert hat nur ein Maximum bei 258 mμ.

Komplexbildung mit KCN

Bei der Reaktion von NAD bzw. NADP mit KCN entsteht ein Cyanidkomplex, dessen Absorptionsspektrum neben dem Maximum bei 258 mμ ein zweites Maximum bei einer Wellenlänge von 325 mμ besitzt. (22) Setzt man der Verbindung mit dem grösseren Rf Wert KCN zu, dann verschwindet das Absorptionsmaximum bei 300 mμ und

wird durch ein anderes bei 330 m μ ersetzt. Abb.(4).

Abb.(4)



Die Verbindung mit dem kleineren Rf Wert zeigt nach KCN das für NAD(P) typische zweite Maximum bei 325 m μ und dürfte daher das nicht umgesetzte NADP repräsentieren.

Nach der Reaktion mit Glucose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase (31) tritt keine Änderung der UV Absorption der Verbindung mit dem grösseren Rf Wert auf.

Unter gleichen Bedingungen wird NADP⁺ (untere Bande) hydriert, wobei das typische zweite Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 340 m μ auftritt.

Durch Bestimmung des Verhältnisses von Ribose zu Phosphat und durch Analyse der Spaltprodukte nach wässriger und saurer Hydrolyse wurde die Verbindung später identifiziert.

2. Einbau von Nikethamid (Nikotinsäure-diäthylamid) in NAD und NAD-P.

a. Nikethamid-AD:

Gleichartige Versuche wie mit dem 5-Fluornikotinamid wurden unter Zugabe von Nikethamid zur Inkubationslösung durchgeführt. 0,542 m Mol NAD wurden in 43,5 ml Phosphatpuffer von PH 6,6 gelöst und Nikethamid in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-1}$ molar hinzugegeben. Zu dieser Lösung wurden 6,6 ml Schweinegehirnhomogenat (10 mg N/ml) zugesetzt und 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Darauf wurde das Enzymprotein ausgefällt, abzentrifugiert und die überstehende Lösung durch Ionenaustauschchromatographie in ihre Komponente zerlegt. (Abb.5)

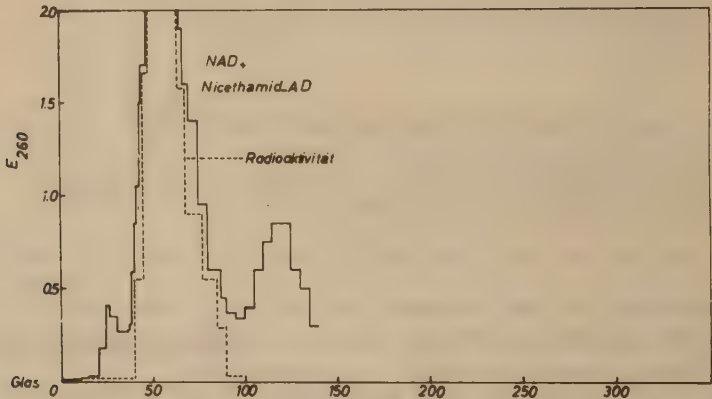


Abb.5: Ionenaustauschchromatographie der Reaktionsprodukte von NAD und Nikethamid nach Einwirkung der Glycohydrolase aus Schweinegehirnhomogenat. Austauscher: Dowex 1x10 Formiat Form. Eluiert mit 0,1n Ameisensäure.

Abb. 5 zeigt, dass in diesem Versuch nicht nur eine einheitlich erscheinende Bande auftritt, sondern noch weitere Spaltprodukt vorhanden sind.

Da die Fragestellung dieser Arbeit sich jedoch nur auf die Herstellung und Identifizierung der NAD(P) Analogen beschränken soll, wurde nicht versucht, alle Spaltprodukte zu charakterisieren.

Durch Verwendung von H_3 markiertem Nikethamid war es möglich, die Bande herauszufinden, die Radioaktivität aufwies. Abb.(5) Sie war hauptsächlich in der Fraktion zwischen Glas 45-95 lokalisiert. Die radioaktive Substanz der NAD-Bande, die nach Gefriertrocknung der Elutionsflüssigkeit sich papierchromatographisch von NAD abtrennte (Abb.6), wurde zur weiteren Analyse verwendet.



Nikethamid-AD
NAD

nicht aktiv daher
nicht identifiziert

Abb.(6): Papierchromatographische Trennung der NAD Bande (Glas 45-95) (Siehe Abb.5). Lösungsmittel: Isobuttersäure-Ammoniak-Wasser im Verhältnis 60:1:33.

r. Nikethamid-ADP:

Gleichartige Versuche wurden mit NADP als Substrat durchgeführt, wobei eine relativ bessere Trennung erzielt wurde. (Abb.7).

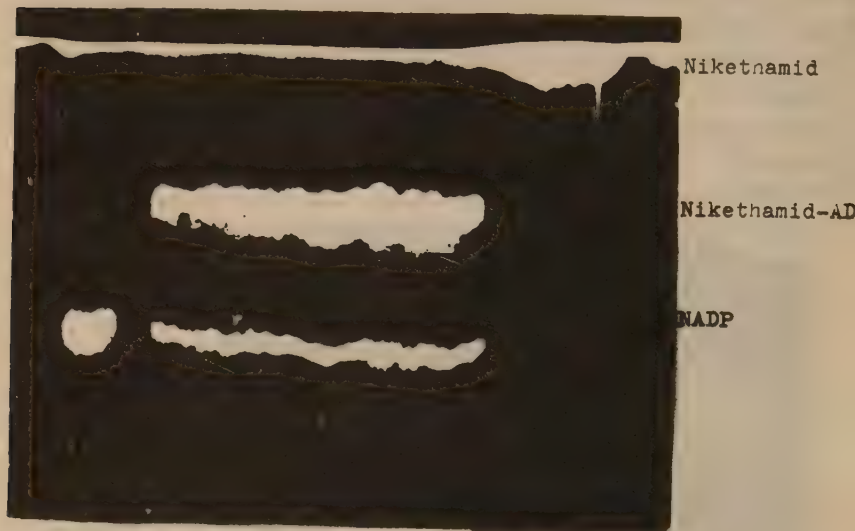
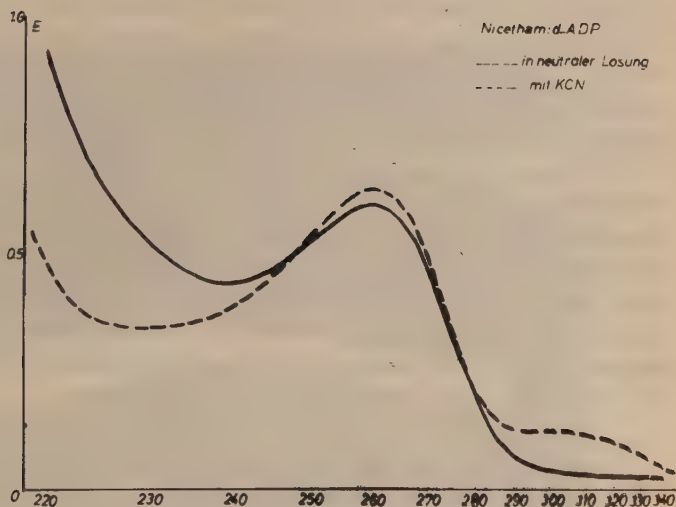


Abb.(7): Papierchromatographische Trennung der bei der Ionenaustauschchromatographie erhaltenen Reaktionsprodukte nach der Inkubation von Nikethamid mit NADP.

Die UV-Spektren der von NAD bzw. NADP abgetrennten radioaktiven Verbindungen unterscheiden sich im neutralen, sauren und alkalischen Milieu nicht von denen des NAD(P). Nach Einwirkung von KCN tritt statt des für NAD(P) charakteristischen zweiten Maximum bei 325 m μ , ein zweites Maximum bei 314 m μ auf. Abb.(8). Dieses Verhalten zeigt bezeichnenderweise auch Nikotinsäure-Adenin-dinucleotid.(41)

Abb. (8)



Die Verbindungen lassen sich mit Dithionit, jedoch nicht mit Alkohol + Alkoholdehydrogenase bzw. Glucose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphat-dehydrogenase hydrieren und verhalten sich damit im Prinzip wie das Nikotinsäuremonoäthylamid-Analoge des NAD (36).

3. Einbau von Nikotin in NADP.

Gleichartige Versuche wie mit dem Nikethamid und 5-Fluornikotinamid wurden unter Zugabe von Nikotin zur Inkubationslösung durchgeführt. 0,130mMole NADP wurden in 19 ml Phosphatpuffer von PH 6,6 gelöst, und Nikotin in einer Endkonzentration von $1,10^{-1}$ molar hinzugesetzt. Dieser Lösung wurden 6 ml Rattenmilzmikrosomen (1,68 mg/ml N) zugesetzt und der gesamte Reaktionsansatz 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Darauf wurde das Enzymprotein ausgefällt, abzentrifugiert und die überstehende Lösung durch Ionenaustauschchromatographie in ihre Komponente zerlegt.

Es trennen sich schon bei diesem Arbeitsgang eine kleinere Bande (Glas 81-120) von einer sehr viel grösseren (Glas 20-80) ab. Abb.(9)

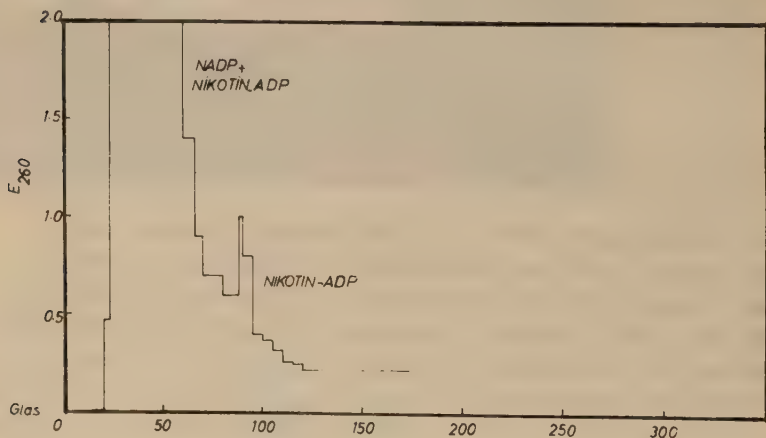


Abb.9: Ionenaustauschchromatographie der Reaktionsprodukte von NADP und Nikotin nach Einwirkung der Glycohydrolase aus Rattenmilz-mikrosomen. Austauscher: Dowex 1x10 Formiat Form. Eluiert mit 4n Ameisensäure.

Beide wurden getrennt durch Gefriertrocknung vom Lösungsmittel befreit und durch Papierchromatographie gereinigt.



Abb.(10): Papierchromatographische Trennung der NADP Bande
(Glas 81-120) Lösungsmittel: Isobuttersäure, Wasser,
Ammoniak.

Die grössere Bande enthielt vorwiegend NADP. Die von ihr getrennte Fraktion (Glas 81-120) bestand fast ausschliesslich aus der von NADP differenten Verbindung. Abb.(10).

Die Substanz wurde mit wenig Wasser aus dem Papier gelöst und im Exsiccator getrocknet.

Das UV-Spektrum ist von dem des NAD(P) nicht zu unterscheiden. Doch tritt im Gegensatz zu NAD(P) mit KCN kein zweites Absorptions-Maximum auf. Die Verbindung reagiert nicht mit Glucose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphatdehydrogenase, ist jedoch, wie orientierende Versuche ergeben haben, ein Hemmstoff der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase Reaktion.

4. Einbau von Isonikotinsäureamid in NAD P.

In weiteren Versuchen wurde geprüft, ob Isonikotinsäureamid- (INA) zu einem NADP-Analogen synthetisiert werden kann.

0,130 Mole NADP wurden in 19 ml Phosphatpuffer von PH 6,6 gelöst und Isonikotinamid in einer Endkonzentration von $1,10^{-1}$ molar hinzugesetzt.

Dieser Lösung wurden 6 ml Rattenleber-mikrosomen (1,68 mg/ml N) zugesetzt und der gesamte Reaktionsansatz 4 Stunden bei 37°C . inkubiert. Darauf wurde das Enzymprotein ausgefällt, abzentrifugiert und die überstehende Flüssigkeit durch Ionenaustauschchromatographie in ihre Komponente zerlegt.

Es trennten sich bei diesem Arbeitsgang 3 Fraktionen, wobei die erste (Glas 15-45) ausschliesslich aus freiem Isonikotinsäureamid bestand.

Nach den bisherigen Erfahrungen hätte die Bande (Glas 75-180) eine Mischung von NADP und dem eventuell entstandenen INA-ADP enthalten müssen. Abb.(11)

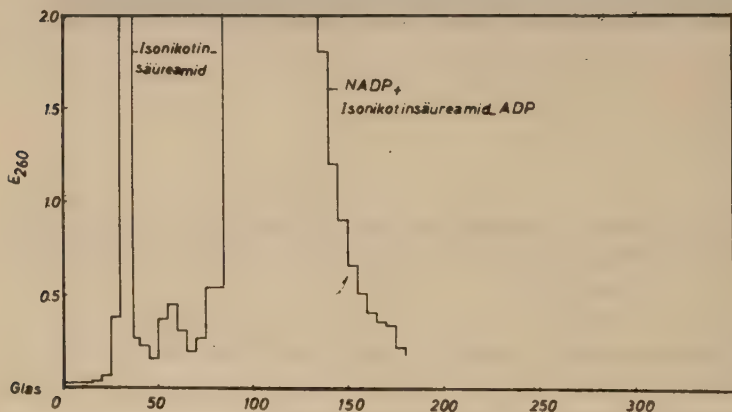


Abb. (11): Ionenaustauschchromatographie der Reaktionsprodukte von NADP und INA nach Einwirkung der Glycohydrolase aus Rattenlebermikrosomen. Austauscher: Dowex 1x10 Formiat. Form.

Eine papierchromatographische Trennung von NADP und INA-ADP gelang jedoch mit keiner der verwendeten Lösungsmittel.

Es wurde mit der Glukose-6-Phosphatdehydrogenase geprüft, ob es sich bei dieser Verbindung um reines NADP handelt.

Dabei fiel auf, dass nach Hydrierung die Relation von E_{260} zu E_{340} nicht dem für NADP zu fordernden Wert entsprach.

Eine grössere Menge der Substanz wurde darauf mit Glukose-6-Phosphat und Glukose-6-Phosphatdehydrogenase in Trispuffer von PH 7,4 inkubiert und die Reaktion nach mehreren Stunden durch Zugabe von Salzsäure beendet. Dabei wird das gebildete $NADPH_2$ zerstört. Der Reaktionsansatz wurde erneut über Ionenaustauscher chromatographiert. Die Substanz in der Bande, die nach der Rechromatographie auftrat, liess sich nicht mehr hydrieren, obwohl sie papierchromatographisch den gleichen R_f Wert wie NADP besass.

Das UV-Spektrum der Substanz ist von dem des NADP nicht zu unterscheiden. Doch tritt im Gegensatz zu NADP mit KCN kein zweites Absorptionsmaximum auf.

Versuche mit Hilfe der Glycohydrolase Reaktion Isonikotinsäure und 6-Hydroxynikotinamid zu transferieren, waren erfolglos. Trotz Variation der Versuchsbedingungen in Bezug auf Inkubationszeit, Fermentmenge, und PH Wert ist es nicht gelungen, entsprechende NAD(P) Analogen zu synthetisieren.

B. Darstellung von NADP—Analogen in vitro durch enzymatischen Austausch von Nikotinsäureamid gegen Chinolin Verbindungen.

1. Einbau von 5-Aminochinolin in NADP .

Gleichartige Versuche wie mit den Pyridinverbindungen wurden unter Zugabe von 5-Aminochinolin zur Inkubationslösung durchgeführt. $0,13 \cdot 10^{-3}$ Mole NADP und $2,5 \cdot 10^{-3}$ Mole 5-Aminochinolin wurden in 17 ml Phosphatpuffer von PH 6,6 gelöst.

Zu dieser Lösung wurden 7,8 ml Rattenmilz-mikrosomen (1,28 mg N/ml) zugesetzt und 6 Stunden bei 37°C inkubiert.

Darauf wurde das Enzymprotein ausgefällt, abzentrifugiert und die überstehende Lösung durch Ionenaustauschchromatographie in ihre Reaktionsprodukte zerlegt. Abb.(12).

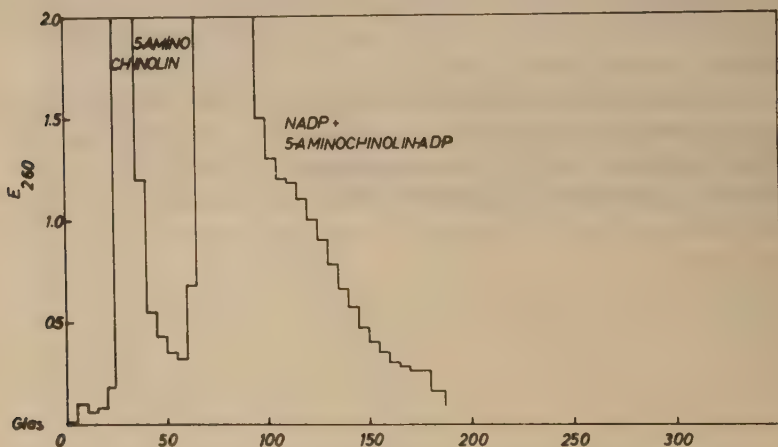


Abb. 12: Ionenaustauschchromatographie der Reaktionsprodukte von NADP und 5-Aminochinolin nach Einwirkung der Glycohydrolase aus Rattenmilz-mikrosomen. Austauscher: Dowex 1x10 Formiat Form. Eluiert mit 4n Ameisensäure.

Die zwei Fraktionen Abb. (12) (Glas 20-50, und Glas 61-180), wurden nach der Gefriertrocknung der Elutionsflüssigkeit papierchromatographisch weiter gereinigt.

Die in der ersten Fraktion enthaltene orange rötliche Substanz erwies sich im Rf Wert und UV-Spektrum identisch mit freiem 5-Aminochinolin. Die Substanzen der zweiten Fraktion bestanden aus NADP und einer orange gefärbten an der Luft rotbraun werdenden Verbindung, die einen höheren Rf Wert als NADP besitzt und sich papierchromatographisch im Isobuttersäure, Wasser, Ammoniakgemisch gut davon abtrennen lässt.

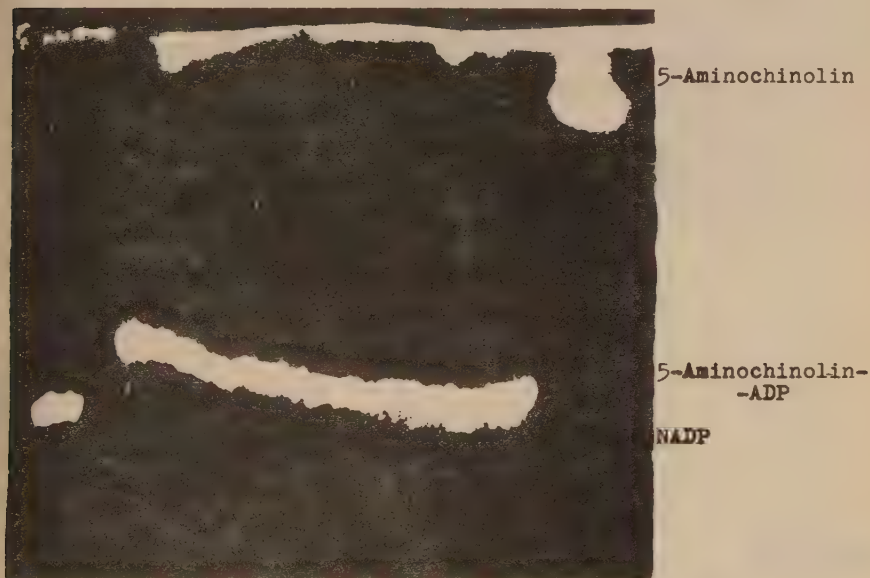


Abb. 13: Papierchromatographische Trennung einer 5-Aminochinolin Verbindung, die einen höheren Rf Wert besitzt als NADP.

Zum Unterschied von NAD(P) und den anderen Pyridinverbindungen ist das UV-Absorptionsmaximum der Substanz im neutralen und sauren

Abb. 13 a

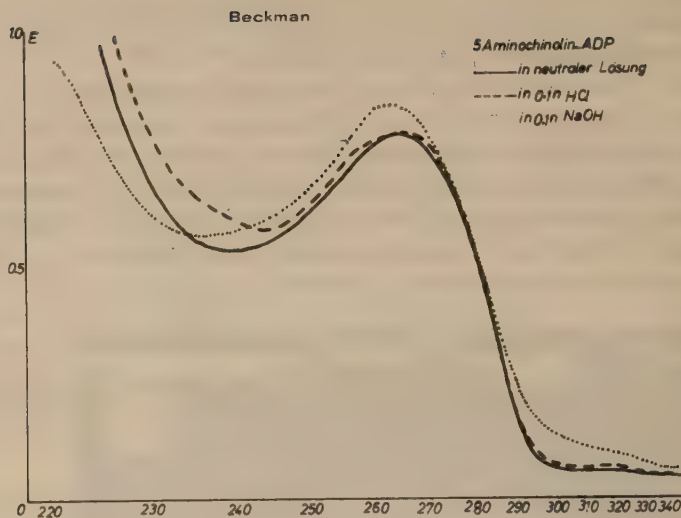
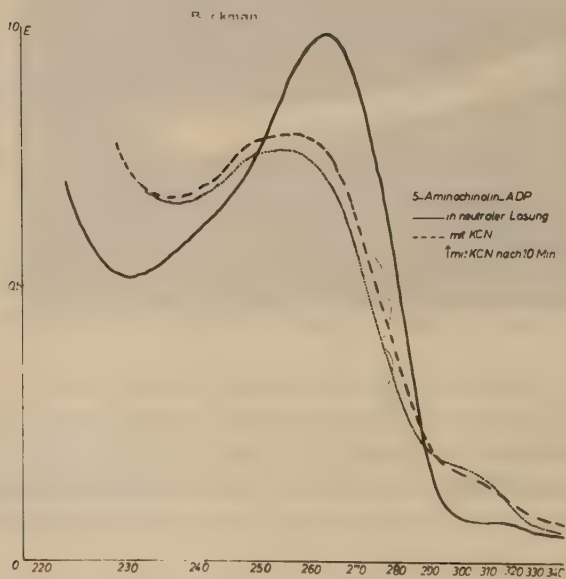


Abb. 13 b



Milieu von 258 m μ nach 262 m μ verschoben. Bei PH 14 liegt es bei 258 m μ . Abb.(13a)

Die offenbar auch mit diesem NAD P—Analogen stattfindende Reaktion mit KCN verursacht ein zweites Maximum bei einer Wellenlänge von 304 m μ . Abb.(13b) Das Verhältnis E_{304}/E_{260} beträgt 1:5.

2. Einbau von 8-Aminochinolin in NADP

Entsprechende Versuche wurden auch mit dem relativ schwer löslichen 8-Aminochinolin durchgeführt.

Nach der Ionenaustauschchromatographie (Abb. 14) und der Gefriertrocknung der Eluate konnten papierchromatographisch auch hier zwei Fraktionen voneinander getrennt werden.

Die mit dem höheren Rf Wert ist gelb gefärbt. Abb. (15)

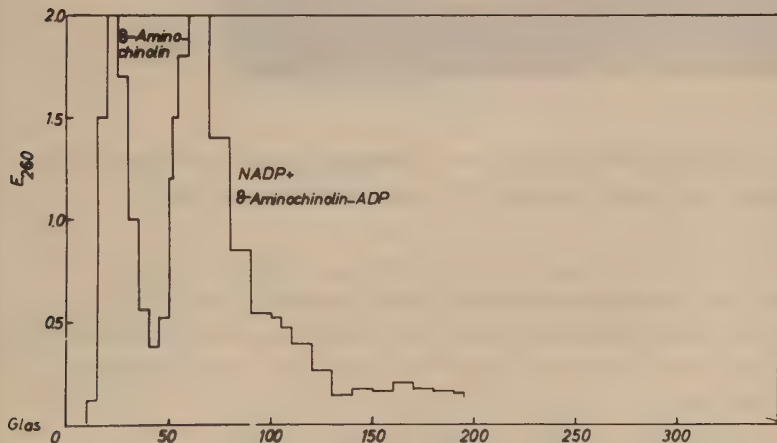


Abb. 14: Ionenaustauschchromatographie der Reaktionsprodukte von NADP und 8-Aminochinolin nach Einwirkung der Glycohydrolase. Austauscher: Dowex 1x10 Formiat Form. Eluiert mit 4n Ameisensäure.

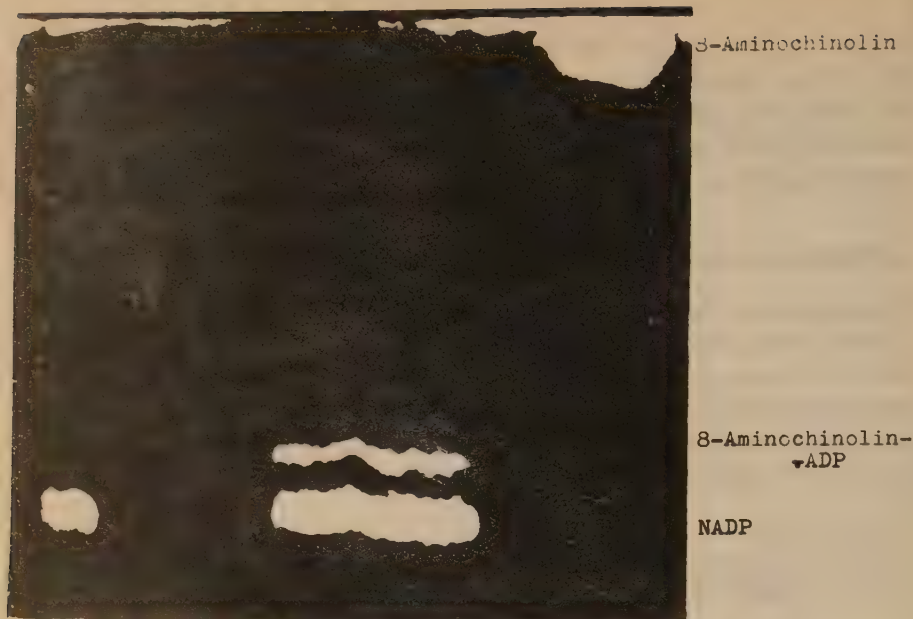


Abb. 15: Papierchromatographische Trennung einer 8-Aminochinolin Verbindung, die einen höheren Rf Wert besitzt als NADP.

Das Nucleotid hat im Vergleich zu NADP ein völlig anderes Spektrum. Das Absorptionsmaximum liegt im neutralen und sauren Milieu bei einer Wellenlänge von 265 m μ und im alkalischen Milieu bei 255 m μ . Abb.(15a) Nach Zusatz von KCN tritt keine weitere Veränderung auf.

3. Einbau von 5-Nitro-8-hydroxychinolin in NADP

Die gelbbraune Verbindung löste sich im Reaktionsmedium nur in ganz geringer Menge. Ein 5-Nitro-8-hydroxychinolin Analoges des NADP war unter diesen Bedingungen nicht herzustellen.

C. Acridine

Die Synthese von NADP-Analogen der schwerlöslichen gelbgefärbten Acridin Verbindungen (Proflavin, Acridin-orange, Acridin) ist unter den im Abschnitt B der "Metnoden" beschriebenen

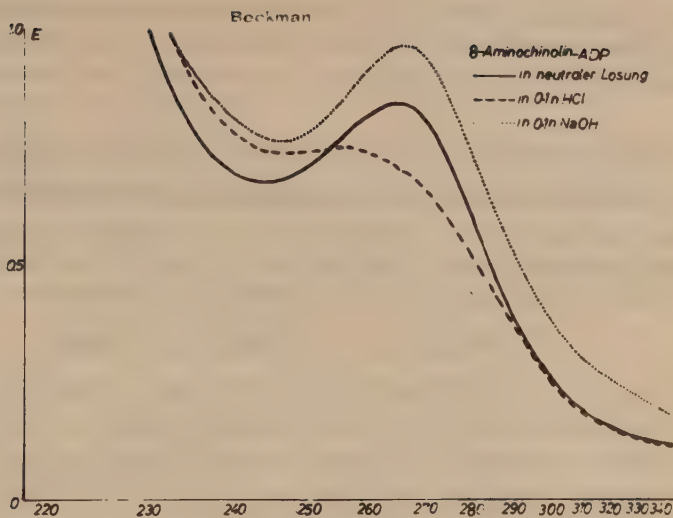


Abb. 15 a

Bedingungen nicht gelungen. Auch mit den gut löslichen Phenazin (Safranin), Phenthiazin (Methylenblau) sowie Piperidin und Piperazin-Verbindungen war ein Austausch mit dem Nikotinsäureamid des NADP nicht möglich.

D. Identifizierung der synthetisierten NAD(P) Analogen.

1. Phosphat und Ribose Bestimmungen der synthetisierten Verbindungen

Wenn es sich bei den synthetisierten Verbindungen um NAD bzw. NADP Analogen handelt, so muss das Verhältnis von Phosphat zu Ribose 2:2 bei NAD und 3:2 bei NADP Analogen sein.

Base : Ribose : Phosphat

Die Bestimmung des Verhältnisses von Base zu Ribose und Phosphat in Nucleotiden beruht bei Verbindungen, deren spezifische Extinktion unbekannt ist, meist auf einem Vergleich mit Substanzen bekannter spezifischer Extinktion, wobei deren Gehalt an Phosphat und Ribose als Bezugssystem dient.

In den eigenen Versuchen wurde eine bestimmte Menge KH_2PO_4 (0,5 μ Mol), AMP, NAD oder NADP (Extinktion bei 260 $\text{m}\mu$ = 1,0/ml) verwendet und mit Lösungen von 5-Fluornikotinamid-ADP, Nikethamid-ADP, Nikotin-ADP, Isonikotinamid-ADP, 5-Aminochinolin-ADP und 8-Aminochinolin-ADP mit einer Extinktion von $E_{260} = 1,0/\text{ml}$ verglichen.

Von diesen Lösungen wurden für die Ribosebestimmung wegen der grösseren Empfindlichkeit der Methode 1,0 ml und für die Phosphatbestimmung 3,0 ml benutzt.

In 20 Versuchen mit 0,5 μ Mol KH_2PO_4 war die Lichtabsorption der Lösung nach der Reaktion mit Ammoniummolybdat und SnCl_2 bei einer Wellenlänge von 725 $\text{m}\mu$ = $802 \pm 43/\text{ml}$.

Wird dieser Wert mit den Ergebnissen der Phosphatbestimmung von NAD und NADP ($E_{260} = 1,0$) verglichen, so ergibt sich für NAD in 20 Versuchen ($E_{725} = 82 \pm 8$) ein Wert von $10,2 \cdot 10^{-8}$ Mol und für NADP in 12 Versuchen ($E_{725} = 135 \pm 8$) ein Wert von $16,8 \cdot 10^{-8}$ Mol.

Unter Zugrundelegung von $18,0 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{Mol}$ bei 260 $\text{m}\mu$ als spezifischer Extinktion des NAD(P) beträgt das Verhältnis von Base zu Phosphat demnach 1:1,84 in NAD und 1:3,03 in NAD(P).

Diese mit den theoretisch zu erwartenden Werten befriedigend übereinstimmenden Daten erlauben es, den Phosphatgehalt der NAD(P)-Analoge als Basis der Analyse zu verwenden.

Die Ergebnisse der Phosphatbestimmung der synthetisierten NAD(P)-Analoge sind aus Tabelle (1) zu ersehen.

Tabelle (1):

Phosphatgehalt von Pyridindinucleotidanaloge

$E_{260}=1,0$	E_{725}	Mole
NAD	82 $\pm$ 8	$10,2 \cdot 10^{-8}$
NADP	135 $\pm$ 8	$16,8 \cdot 10^{-8}$
Nikethamid-AD	70	$8,7 \cdot 10^{-8}$
"	79	$9,8 \cdot 10^{-8}$
"	83	$10,3 \cdot 10^{-8}$
Nikethamid-ADP	104	$12,9 \cdot 10^{-8}$
Nikotin-ADP	107	$13,4 \cdot 10^{-8}$
"	120	$15,0 \cdot 10^{-8}$
5-FNA-ADP	147	$18,3 \cdot 10^{-8}$
INA-ADP	118	$14,7 \cdot 10^{-8}$
5-Aminochinolin-ADP	92	$11,5 \cdot 10^{-8}$
5-Aminochinolin-ADP	90	$11,2 \cdot 10^{-8}$
8-Aminochinolin-ADP	61	$7,6 \cdot 10^{-8}$
8-Aminochinolin-ADP	63	$7,9 \cdot 10^{-8}$

Der Ribosegehalt der synthetisierten Nucleotide wurde in ähnlicher Weise wie bei der Phosphatbestimmung ermittelt, wobei AMP und NADP als Kontrollwerte dienten.

In 15 Versuchen war die Lichtabsorption nach der Reaktion mit Orcin in Salzsäure bei einer Wellenlänge von 668 m μ für AMP ($E_{260}=1,0/\text{ml}$) = 751 $\pm$ 67 und für NAD 940 $\pm$ 90.

Das bedeutet, dass $7 \cdot 10^{-8}$ Mole Ribose bei AMP eine Extinktion von 751 bei einer Wellenlänge von 668 m μ ergeben, $7 \cdot 10^{-8}$ Mole Ribose bei NAD jedoch 593.

Aus bisher nicht geklärter Ursache verläuft unter gleichen Bedingungen die Reaktion mit NAD offenbar nicht quantitativ, jedoch relativ konstant wie M E J B A U M schon 1938 (42) festgestellt hat. Da die Analogen möglicherweise aber labiler sind als NAD(P), wurde bei der Orcinmethode immer sowohl NAD, als auch AMP als Bezugssubstanz mitbestimmt.

In unklaren Fällen wurde ausserdem eine Perjodatbestimmung angeschlossen, die jedoch nur bei NAD-Analogen den genauen Ribosegehalt angibt.

Die Ergebnisse der Ribosebestimmungen der synthetisierten NAD(P)-Analogen sind aus Tabelle (2) zu ersehen.

Tabelle (2):

Ribosegehalt von Pyridindinucleotidanalogen

E ₂₆₀ =1,0	Rechnerisch		Mol bezogen auf AMP	Mol bezogen auf NAD	Direkt mit KJO ₄
	E ₆₆₈	Mol			
AMP	760±67	7.10 ⁻⁸			
NAD	940±90	11,1.10 ⁻⁸			
Nikethamid-AD	1020		9,4.10 ⁻⁸	12,0.10 ⁻⁸	10,3.10 ⁻⁸
"	1022		9,4.10 ⁻⁸	12,1.10 ⁻⁸	
"	1038		9,61.10 ⁻⁸	12,2.10 ⁻⁸	
Nikethamid-ADP	787		7,25.10 ⁻⁸	9,3.10 ⁻⁸	
Nikotin-ADP	800		7,37.10 ⁻⁸	9,45.10 ⁻⁸	
"	945		8,70.10 ⁻⁸	11,1.10 ⁻⁸	
5-FNA-ADP	1160		10,7.10 ⁻⁸	12,5.10 ⁻⁸	
INA-ADP	920		7,65.10 ⁻⁸	9,7.10 ⁻⁸	
5-Aminochinolin-ADF	725		6,7.10 ⁻⁸	8,55.10 ⁻⁸	7,2 .10 ⁻⁸
8-Aminochinolin-ADF	515		4,75.10 ⁻⁸	6,1.10 ⁻⁸	
8-Aminochinolin-ADF	738		6,8.10 ⁻⁸	8,8.10 ⁻⁸	7,9.10 ⁻⁸

Aus den Ergebnissen der Phosphat und Ribosebestimmungen (Tabelle 1 und 2) der synthetisierten NAD(P)-Analogen ist das Verhältnis von Phosphat zu Ribose aus Tabelle (3) zu ersehen.

Tabelle (3):

	Bezogen auf AMP		Bezogen auf NAD		Direkt m. KJO ₄	
	Phosphat	Ribose	Phosphat	Ribose	Phosphat	Ribose
NAD	2	1,69	2	2	2	2
Nikethamid-AD	2	1,86	2	1,44	2	2,14
"	2	2,08	2	1,62		
"	2	2,04	2	1,68		
Nikethamid-ADP	3	1,68	3	2,16		
Nikotin-ADP	3	1,65	3	2,10		
"	3	1,74	3	2,22		
5-FNA-ADP	3	1,74	3	2,01		
INA-ADP	3	1,56	3	1,98		
5-Aminochinolin-ADP	3	1,74	3	2,22	3	1,27
8-Aminochinolin-ADP	3	1,86	3	2,40	3	2,04
8-Aminochinolin-ADP	3	2,54	3	3,33		

Nach diesen Ergebnissen aus Tabelle (3) ist deutlich zu erkennen, dass beim Nikethamid-AD das Verhältnis von Phosphat zu Ribose mit AMP als Bezugssubstanz mit den theoretisch zu erwartenden Werten gut übereinstimmt, mit NAD als Bezugssubstanz der Ribosegehalt jedoch zu gering ist. Da aber auch die Perjodatmethode den theoretisch zu erwartenden Ribosegehalt gibt, kann mit Sicherheit angenommen werden, dass es sich bei den synthetisierten Analogenen um ein Dinucleotid handelt.

Beim Nikethamid-ADP stimmt dagegen das erwartete Verhältnis von Phosphat zu Ribose mit 3:2 nur mit NAD als Bezugssubstanz überein. Beim Nikotin-ADP, 5-Fluornikotinamid-ADP, Isonikotinamid-ADP, 5-Aminochinolin-ADP und 8-Aminochinolin-ADP war das Verhältnis von Phosphat zu Ribose mit NAD als Bezugssubstanz ebenfalls befriedigend.

2. Hydrolyse

Zur weiteren Identifizierung wurden aus den synthetisierten NAD(P)-Analogen die freien Basen in neutraler und saurer Lösung wieder abgespalten.

Die nach der Hydrolyse auftretenden Spaltprodukte wurden papierchromatographisch getrennt und ihre Rf Werte und UV-Spektren mit denen der primär eingesetzten freien Basen, die in gleicher Weise behandelt waren, verglichen.

Wässrige Hydrolyse:

Bei mehrstündiger wässriger Hydrolyse der synthetisierten Verbindungen in einem kochenden Wasserbad oder im Trockenschrank bei 120°C zeigte sich nach papierchromatographischer Trennung der Spaltprodukte, dass unter den Bedingungen, unter denen NAD(P) vollständig hydrolysiert wird, einige Analogen nicht quantitativ gespalten wurden.

Sie sind erst durch saure Hydrolyse (in n/10 HCl) in relativ kurzer Zeit in ihre Komponente zu spalten.

Saure Hydrolyse:

Bei saurer Hydrolyse zerfallen die NAD(P)-Analoge in einen UV-Licht absorbierenden Adenin und Pyridin oder Chinolin-anteil, deren UV-Spektren Abb. 15-, a, b, c, d, e und f zeigen.

Abb. 5a

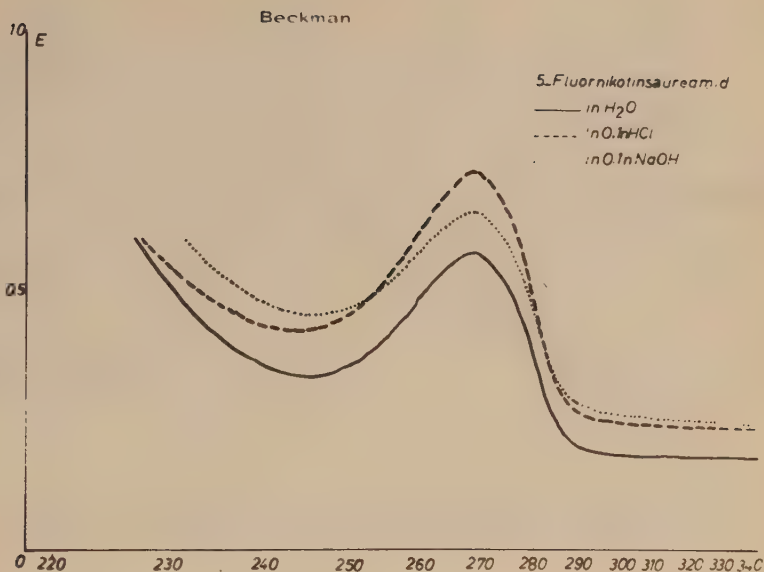
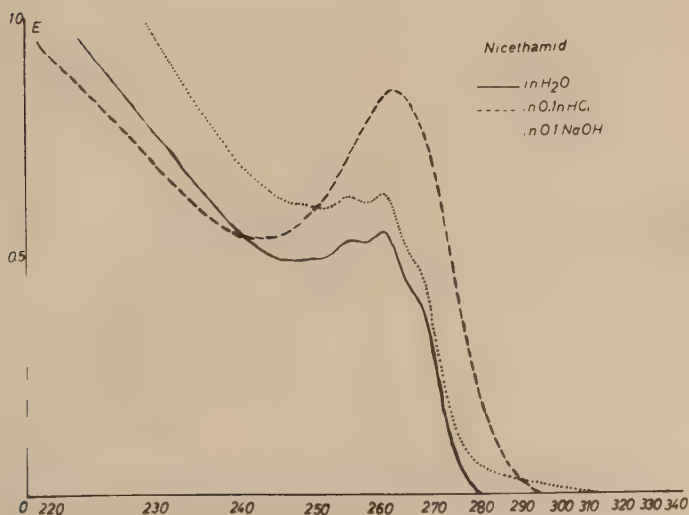
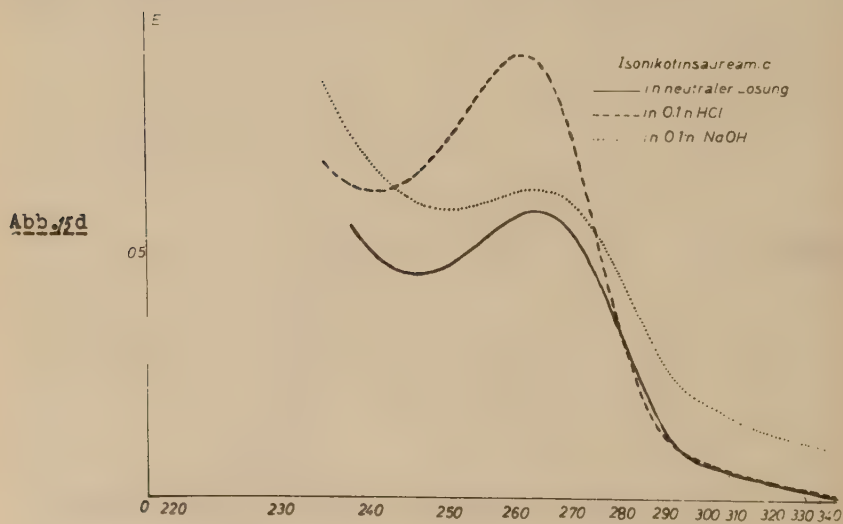
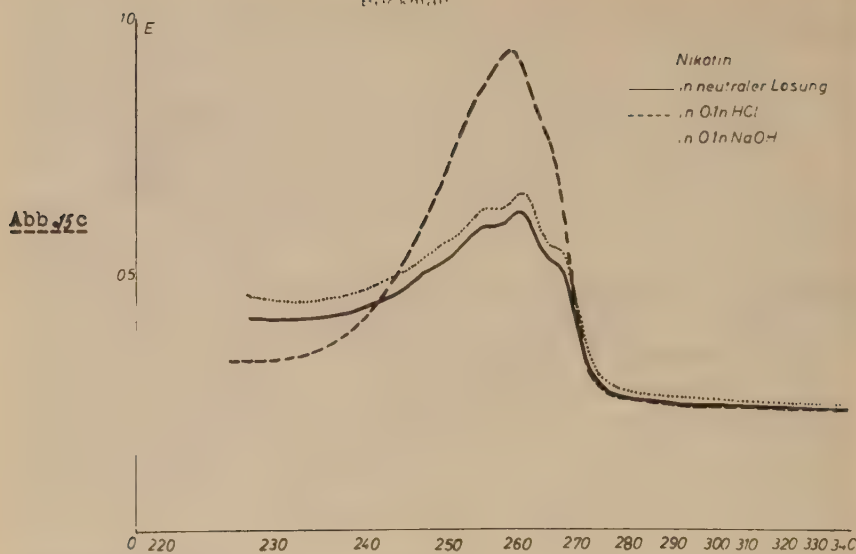
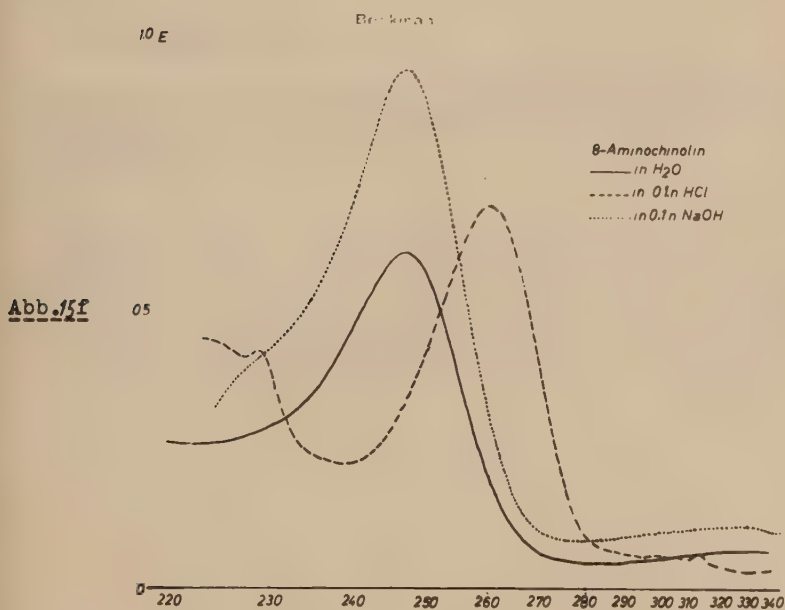
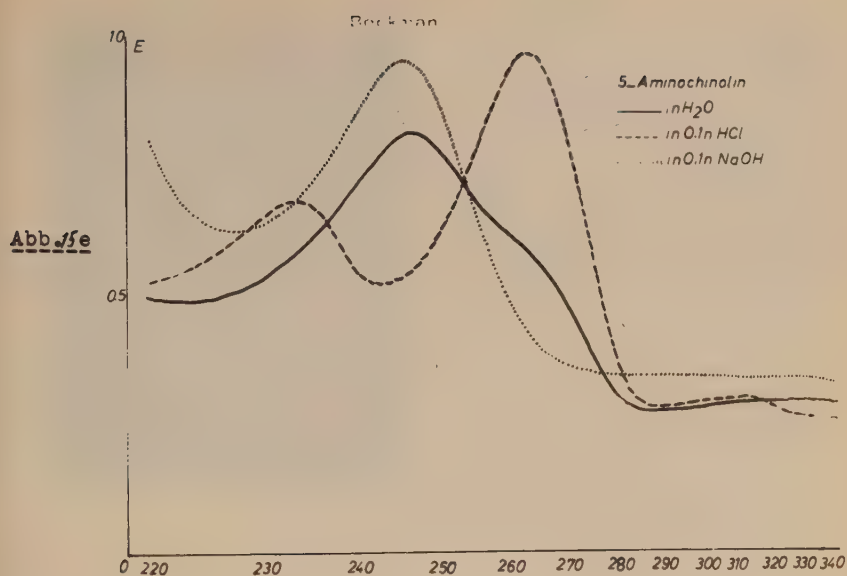


Abb. 5b



Buckman





5-FNA-ADP:

Unter den angeführten Bedingungen zerfiel das synthetisierte 5-FNA-ADP in Adenin und eine Verbindung, die mit freiem 5-FNA nicht identisch ist, die aber auch bei der Hydrolyse der freien Base in 0,1n Salzsäure auftritt.

Es konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um Nikotinsäureamid oder Nikotinsäure handelt, die aus NAD(P) abgespalten werden würde. Eine Identifizierung gelang nicht. Abb.(16)



Lösungsmittelfront

5-Fluornikotinamid nach
der Hydrolyse

??

Adenin

**5-FNA- ADP
Hydrolyseprodukte**

Abb. 16: Papierchromatographische Trennung der Hydrolyseprodukte (in 0,1n HCl) von 5-FNA-ADP im n-Propanol, Wasser, Ammoniakgemisch.

Nikethamid-AD: Bei saurer Hydrolyse des Nucleotids und des Nikethamids zeigte sich nach papierchromatographischer Trennung, dass das Nucleotid in Adenin, Nikotinsäure und Nikethamid gespalten wurde. Die durch die Hydrolyse des Nucleotids isolierten Nikethamid- und Nikotinsäure waren beide radioaktiv. Abb.(17).



Nikethamid

??

NS

Adenin

Nikethamid NS Nikethamid Nikethamid-AD
Hydrolysiert Hydrolyseprodukte

Abb. (17): Papierchromatographische Trennung der Hydrolyseprodukte (in 0,1n HCl) von Nikethamid-AD, Nikethamid, Nikotinsäure und unhydrolysiertem Nikethamid als Vergleichssubstanz. Lösungsmittel: n-Propanol, Wasser, Ammoniak im Verhältnis 60:10:30

Nikethamid ADP

Wie bei Nikethamid-AD ergab das Nikethamid-ADP nach der Hydrolyse in 0,1n HCl Adenin und freies Nikethamid, dagegen keine Nikotinsäure Abb. (18).



Nikethamid

NS

Adenin

NS, Nikethamid nach Nikethamid-ADP Adenin
Hydrolyse nach Hydrolyse

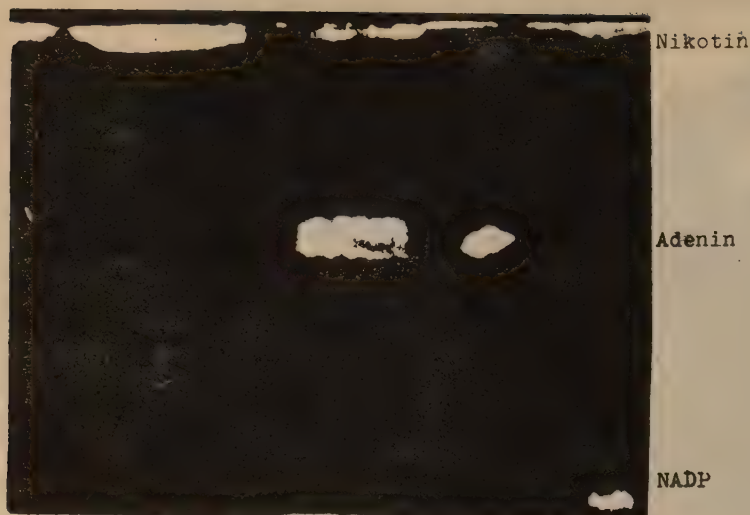
Abb.18: Papierchromatographische Trennung der Hydrolyseprodukte (in 0,1n HCl) von Nikethamid und Nikethamid-ADP.

Nikotinsäure und Adenin dienten als Vergleichssubstanzen.

Lösungsmittel: n-Propanol, Ammoniak, Wasser im Verhältnis 60:30:10

Nikotin-ADP

Bei saurer Hydrolyse des Nucleotids und des Nikotins zeigte sich nach papierchromatographischer Trennung der Spaltprodukte, dass das Nucleotid in Adenin und Nikotin gespalten wurde (Abb.19).



Nikotin	Nikotin	Nikotin ADP	Adenin	NADP
	hydrolysiert	hydrolysiert		

Abb. (19):

Papierchromatographische Trennung der Spaltprodukte von Nikotin und Nikotin-ADP. NADP, Adenin und Nikotin dienten als Vergleichssubstanzen.

Lösungsmittel: n-Propanol, Ammoniak, Wasser im Verhältnis 60:30:10

Isonikotinsäureamid-ADP

Nach saurer Hydrolyse des Nucleotids und des Isonikotinsäureamids unter gleichen Bedingungen zeigte sich nach papierchromatographischer Trennung der Spaltprodukte, dass das Nucleotid in Adenin, INA und Isonikotinsäure gespalten wurde, Abb.(20) und Abb. (21)



Isonikotinamid

Isonikotinsäure

Adenin

INA	INA	INA-ADP	Adenin	INS
	hydrolysiert	hydrolysiert		

Abb.(20): Papierchromatographische Trennung der Spaltprodukte von INA und INA-ADP. Adenin, INA und Isonikotinsäure dienten als Vergleichssubstanzen.

Lösungsmittel: n-Propanol, Ammoniak, Wasser im Verhältnis 60:30:10

5-Aminochinolin-ADP

Nach saurer Hydrolyse des Nucleotids und des 5-Aminochinolins unter gleichen Bedingungen zeigte sich nach papierchromatographischer Trennung der Spaltprodukte, dass das Nucleotid in Adenin und 5-Aminochinolin gespalten wurde, aber ein Teil des nicht hydrolysierten Nucleotids an der Startlinie verblieb.

Abb. (22)



5-Aminochinolin nach der
Hydrolyse

Adenin

Nicht hydrolysiertes
5-Aminochinolin-ADP

5-Amino- 5-Amino-
chinolin chinolin
hydrolysiert

5-Amino- Adenin
chinolin-ADP
hydrolysiert

Abb.(22): Papierchromatographische Trennung der Spaltprodukte von 5-Aminochinolin und 5-Aminochinolin-ADP.

Adenin und 5-Aminochinolin dienen als Vergleichssubstanzen.

Lösungsmittel: n-Propanol, Ammoniak, Wasser im Verhältnis 60:30:

8-Aminochinolin-ADP

Wie bei 5-Aminochinolin-ADP ergab das 8-Aminochinolin-ADP nach saurer Hydrolyse Adenin und 8-Aminochinolin.

Es kann somit festgestellt werden:

Die synthetisierten Dinucleotide unterscheiden sich von NAD(P) in mehreren Eigenschaften.

- 1) Die Rf Werte sind mit Ausnahme von INA-ADP immer grösser als die des NAD(P).
 - 2) Die UV-Spektren der Analogen im neutralen, sauren und alkalischen Milieu bzw. nach Einwirkung von KCN differieren nicht nur von NAD(P), sondern auch untereinander.
 - 3) Die Phosphat und Ribosebestimmungen ergaben die für die Nucleotide zu fordernden Ergebnisse.
 - 4) Die Rf Werte und die Spektren der freien Basen, die nach saurer Hydrolyse der synthetisierten Dinucleotide papierchromatographisch auftraten, sind mit Ausnahme des 5-Fluornikotinamids mit den Spektren der reinen für die Glycohydrolasereaktion als Substrat eingesetzten Basen identisch.
- Damit kann als erwiesen gelten, dass eine enzymatische Synthese der NAD(P)-Analoge von 5-Fluornikotinamid, Nikethamid, Nikotin, Isonikotinamid, 5-Aminochinolin und 8-Aminochinolin zumindest in vitro erfolgt.

Von den vielen in vitro gebildeten NAD(P)-Analoge konnten nach Vergiftung mit den entsprechenden Basen bisher nur das 3-Acetylpyridin-AD(P) (36,39), das 6-Aminonikotinamid-AD(P) (14,29) sowie das Thiadiazol-AD (19) auch in vivo nachgewiesen werden. Die Analoge waren noch 16 Stunden nach der Gabe des Antimetaboliten vorhanden. 250 mg/Kg 5-Fluornikotinamid oder 5-Amino- bzw. 8-Aminochinolin zeigten bei Ratten 16 Stunden nach der Applikation keine auffälligen Veränderungen. Es ist auch nicht gelungen, aus der Leber die NAD(P)-Analoge dieser Verbindungen zu isolieren. Obwohl unter den gewählten Bedingungen keine Synthese dieser Nucleotide nachweisbar war, kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass zu einem früheren Zeitpunkt oder nach chronischer Gabe die in vitro stattfindende Bildung von 5-Fluornikotinamid-ADP, 5-Amino- bzw. 8-Aminochinolin-ADP auch in vivo eintritt.

IV. D I S K U S S I O N

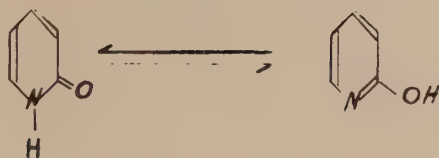
Durch die relativ geringe Spezifität der NAD(P) Nucleosidase können physiologisch nicht vorkommende Pyridinnucleotide gebildet werden. Die Synthese derartiger NAD(P)-Analogen hängt von sehr vielen Faktoren ab.

Sie wird einmal durch das bei der Hydrolyse von NAD(P) auftretende Nikotinamid beeinflusst, denn Nikotinamid steht mit dem Antimetaboliten in Konkurrenz um den Enzymkomplex. (39,11)

In der Regel wird dieser eine wesentlich geringere Affinität zur Nucleosidase besitzen, als der natürliche Reaktionspartner. Die Konzentration von 3-Acetylpyridin muss z.B. mindestens 10 mal höher sein, als die von Nikotinamid, damit ein Austausch überhaupt stattfindet. Erst bei 100 fach höherer Konzentration kann 3-Acetylpyridin das Nikotinamid vollständig verdrängen. (11, 39) Daraus folgert, dass Substanzen, die nicht oder nur schlecht im Reaktionsmedium löslich sind, in vitro auch nicht zu NAD(P)-Analogen synthetisiert werden können, weil die bei der Hydrolyse von NAD(P) entstandene Nikotinamid-Menge meist so gross wird, wie die maximal erreichbare Konzentration der Antimetaboliten. Dazu gehören von den in dieser Arbeit untersuchten Substanzen 5-Nitro-8-hydroxychinolin sowie Acridin und Proflavin, obwohl bei den letzteren Verbindungen sicher auch sterische Hemmnisse zu berücksichtigen sind.

Aber auch mit Substanzen, die unter den gewählten Bedingungen vollständig in Lösung gingen, ist der Austausch zwischen Nikotinamid und Nikotinamidantagonisten sehr unterschiedlich. Bei Verwendung der gleichen Enzymmenge einer Glycolhydrasepräparation und unter standardisierten Bedingungen hinsichtlich Inkubationsdauer und PH Wert des Reaktionsansatzes lässt sich zeigen, dass 6-Aminonikotinamid auf NAD(P) transferiert wird, während mit 6-Hydroxynikotinamid kein NAD(P)-Analoges entsteht. Dies kann dadurch erklärt werden, dass z. B. beim α -Hydroxypyridin das Tautomeriegleichgewicht weitgehend auf die Seite des α -Pyridons

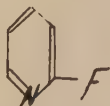
verschoben ist. (45)



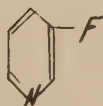
Bei entsprechendem 4-Amino-pyridin ist dagegen die Amino-Verbindung vor der Imino-Verbindung bevorzugt. (62)



Entsprechende Tautomeriegleichgewichte könnten beim 6-Hydroxynikotinamid und beim 6-Aminonikotinamid vorhanden sein. Schon früher ist bei vergleichenden Untersuchungen mit 2-, 3-, und 4-Acetylpyridin gezeigt worden (15), dass die an der Position 2 substituierte Verbindung nicht transferierbar war, und dass sich in vitro mit 4-Acetylpyridin wesentlich besser ein falsches Pyridinnucleotid bildete, als mit 3-Acetylpyridin. Dies könnte auf der Erniedrigung der Basizität am heterocyclischen Stickstoff beruhen, denn der Einfluss Elektronen anziehender Substituenten, wie z.B. $-\text{C}-\text{CH}_3$, $-\text{C}\equiv\text{N}$ oder Fluor nimmt von Position 4 über 3 zu 2 zu. (2)

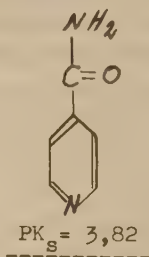
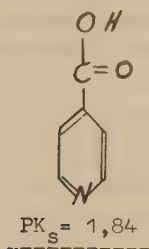


$\text{PK}_\text{S} = -0,4$



$\text{PK}_\text{S} = 3,0$

Die dem Stickstoff benachbarten Substituenten in Stellung 2 bzw. 6 scheinen daher für eine Transferierung von besonderer Bedeutung zu sein. Interessanterweise lassen sich keine der untersuchten Verbindungen mit kondensierten Ringen (Acridin, Phenazin und Phen. thiazin), in denen der im Prinzip reaktionsfähige Stickstoff relativ eingeengt ist, zu NAD(P)-Analoge synthetisieren. Acridin ist z.B. im Gegensatz zu Pyridin oder Chinolin mit Methyljodid infolge sterischer Hinderung nur langsam quarternierbar. (1) Die Basizität kann in diesem Fall keine ausschlaggebende Rolle spielen, da der PK_s Wert des Acridins "5,6" dem des 5-Aminochinolins "5,5" (2) entspricht. Chinolinderivate werden, möglicherweise weil sie sehr leicht mit Methyljodid reagieren, sofern sie nur im Reaktionsmedium ausreichend löslich sind, gegen Nikotinsäureamid ausgetauscht. Für die Bildung von NAD(P)-Analoge ist aber offenbar nicht nur die Substitution an der dem Stickstoff benachbarten Position und die sterische Hinderung von Bedeutung. Schon K a p l a n und Mitarbeiter (41), sowie T h r e l f a l l (54) haben gezeigt, dass die Glycohydrolase Nikotinsäure viel schlechter auf Adenosindiphosphatribose überträgt, als Nikotinsäureamid. Die Synthese eines Isonikotinsäureanaloge des NAD(P) ist trotz mehrfachem Bemühen mit Nucleosidasepräparationen aus verschiedenen Organen bisher nicht gelungen. (30). Isonikotinsäureamid wird dagegen ausserordentlich gut transferiert. Es wäre denkbar, dass in diesem Falle wieder die Basizität von Bedeutung ist (2,61), denn der PK_s Wert des Isonikotinamids



ist mit 3,82 deutlich höher, als der der Isonikotinsäure mit 1,84. Aus diesem Grund kann die Anlagerung der Isonikotinsäure an den

Enzymkomplex beeinträchtigt sein.

Inwieweit sich aus den vorgelegten Befunden und aus den in der Literatur ersichtlichen Angaben Beziehungen zwischen der Synthese von NAD(P)-Analogen und pharmakologisch-toxischen Wirkungen ableiten lassen, ist in der Tabelle 4 dargestellt. Aus ihr geht recht klar hervor, dass eine Substanz, die in vitro zu NAD(P)-Analogen synthetisiert werden kann, keineswegs auch in vivo zur Bildung eines abnorm strukturierten Pyridinnucleotids verwendet wird. Dies mag durch den verschiedenen ablaufenden Stoffwechsel der Substanzen, durch ihre Fähigkeit, die Zellwand zu durchdringen, und andere Faktoren bedingt sein.

Es lässt sich auch keine generelle Korrelation zwischen einem Nikotinamidantagonismus, der pharmakologisch-toxischen Wirkung und der Synthese eines falschen Nucleotids feststellen. Bestimmte Effekte des Cytostaticums Trenimon oder des Reserpins und der Phenthiazine werden durch Nikotinsäureamid synergistisch oder antagonistisch beeinflusst, obwohl diese Verbindungen sicher keine NAD(P) Analogen bilden.

Auch muss angenommen werden, dass der pharmakologische Effekt, der in dieser Arbeit untersuchten Substanzen, nicht unbedingt mit ihrer Fähigkeit, in vitro das Nikotinamid im NAD(P) zu verdrängen, in Verbindung steht. Ob sie vom NAD(P) unabhängige bisher nicht bekannte Funktionen des Nikotinamids beeinträchtigen, ist nicht untersucht.

Tabelle 4:

* = 16 Stunden nach einer einmaligen Dosis von 250 mg/kg

* = 16 Stunden nach einer einmaligen Dosis von 150 mg/kg

Leer = nicht untersucht

Substanz	Synthese		Pharmakol. Wirkung am Warmblüter		Aufhebung der pharmakol. bzw. toxischen Wirkung durch Nikotinamid
	in vitro	in vivo	akut	nach einer Latenz von 3 Stunden	
5-Fluornikotinamid	ja (24)	nein *		ja (52)	ja (52)
6-Aminonikotinamid	ja (14, 29)	ja (14, 29)		ja (34)	ja (34)
Nikethamid	ja		ja		nein
3-Acetylpyridin	ja (35, 36)	ja (5, 16)		ja (58)	ja (58)
Nikotin	ja		ja		
Isonikotinsäureamid	ja		nein	nein	
Isonikotinsäure	nein		nein	nein	
Isonikotinsäurehydrazid	ja	nein (14)	ja	ja	? (8)
4-Acetylpyridin	ja (15, 16)	nein (15)	nein	nein	
2-Acetylpyridin	nein (15)		nein	nein	
5-Aminochinolin	ja	nein *	nein	nein	
8-Aminochinolin	ja	nein *	nein	nein	
5-Nitro-8-hydroxychinolin	nein		nein	ja (51)	?
1,2,3, Thiadiazol	ja (19)	ja (19)		ja (19)	ja (19)
Trenimon				ja	ja (52)
Roserpin			ja		nein (18)
Chlorpromazin			ja		Verstärkung nein (18) Verstärkung

V. Z U S A M M E N F A S S U N G

Zur enzymatischen Synthese von unnatürlich strukturierten Nucleotiden wurde die transferierende Eigenschaft der Glycohydrolase ausgenutzt, um Pyridin-, Chinolin- und Acridin-Verbindungen gegen das Nikotinsäureamid des NAD(P) auszutauschen. Dabei ergaben sich folgende Befunde:

1. Nach der Inkubation von Pyridin-Verbindungen in Phosphatpuffer von PH 6,6 bei 37°C entstehen in Gegenwart von Rattengehirn- Milz oder Leber-Mikrosomen physiologisch nicht vorkommende Pyridinnucleotide, die nach Ionenaustauschchromatographie, Gefriertrocknung und papierchromatographischer Trennung isoliert wurden.

Es gelang ein Nikethamid-, Nikotin-, Isonikotinamid- und 5-Fluornikotinamid-Adenindinucleotid-Phosphat zu synthetisieren und die Verbindungen durch Ribose- und Phosphat-Bestimmungen, UV-Spektrenvergleich im neutralen, sauren und alkalischen Milieu, Komplexbildung mit KCN, saurer Hydrolyse und zum Teil durch Radioaktivitätsmessung zu identifizieren und zu charakterisieren. Mit Isonikotinsäure und 6-Hydroxynikotinamid war eine Bildung von NADP-Analogen unter den gleichen Versuchsbedingungen nicht zu erreichen.

2. Als Chinolin-Verbindungen konnten NADP-Analoge des 5- und 8-Aminochinolins enzymatisch hergestellt werden. Ein Austausch von 5-Nitro-8-hydroxychinolin gegen Nikotinsäureamid des NADP ist nicht gelungen.

3. Bemühungen mit Acridin-Verbindungen NADP-Analoge zu bilden, führten trotz zahlreicher Änderung der Versuchsbedingungen zu einem negativen Ergebnis.

Es war auch nicht möglich, mit Piperidin, Piperazin, Safranin und Methylenblau NADP-Analoge herzustellen.

4. Die Synthese von NAD(P)-Analogen in vivo mit 5-Fluornikotinamid, 5-Amino- oder 8-Aminochinolin und 5-Nitro-8-hydroxychinolin als Pharmaka ist nicht gelungen.

VI. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Albert, A.: Chemie der Heterocyclen, Verlag Chemie GmbH, Weinheim/Bergstr., 331-333 (1962)
2. Albert, A. s. unter 1. Seite 85
3. Alivisatos, S. G. A.: Mechanism of action of diphosphopyridine nucleotidases, Nature, 183, 1034 (1959)
4. Alivisatos, S. G. A.; and D. W. Woolley: Synthesis of 5-amino-4-carboxamidoimidazole-AD, J. Amer. Chem. Soc. 77, 1065 (1955)
5. Alivisatos, S.G.A.; F. Ungar, L. Lukacs and L. La Mantia: Imidazolytic processes, J. Biol. Chem. 235, 1742 (1960)
6. Alivisatos, S. G. A.: Nature, 181, 271 (1958)
7. Anderson, B. M. and N. O. Kaplan: Enzymatic studies with analogs of diphosphopyridine nucleotide, J. Biol. Chem. 234, 1226 (1959)
8. Balzer, H., P. Holtz und D. Palm: Untersuchungen über die biochemischen Grundlagen der konvulsiven Wirkung von Hydraziden, Arch. exp. Path. Pharm. 239, 520-552 (1960)
9. Barnum, C. P., C. W. Nash, E. Jennings, O. Nygard and H. Vermund: The separation of pentose and desoxypentose nucleic acids from isolated mouse liver cell nuclei, Arch. Biochem. 25, 376 (1950)
10. Berenblum, A. and E. Chain: An improved method for the colorimetric determination of phosphate, Biochem. J. 32, 295 (1958)
11. Brunnemann, A. und H. Coper: Hydrolyse von NAD(P) und Biosynthese von 3-APAD(P) durch Hirnmikrosomen verschiedener Tierarten. Arch. exp. Path. Pharmak. 250, 469-478 (1965)
12. Brunnemann, A. und H. Coper: Vergleichende Untersuchungen über die Biosynthese der NAD(P)- Analogen des 3-acetylpyridins, 4-Acetylpyridins, 6-Aminonikotinamids und Isonikotinsäurehydrazids. Arch. exp. Path. Pharmak. 248, 514 (1964)
13. Brunnemann, A. und H. Coper: Untersuchungen zur Wirkungsweise des Pyridin-3-methylcarbinol. Arch. exp. Path. Pharmak. 247, 315 (1964)

14. Brunnemann, A., H. Coper und D. Neubert: Biosynthese und Wirkung des 6-Aminonikotinamid-adenin-dinucleotids (6-ANAD). Arch. exp. Path. Pharmak. 246 437 (1964)
15. Brunnemann, A., H. Coper und H. Herken: Isolierung von 3-Acetylpyridin-adenindinucleotid (3-APAD) aus dem Gehirn 3-Acetylpyridin-vergifteter Ratten. Arch. exp. Path. Pharmak. 244, 223 (1962)
16. Brunnemann, A., H. Coper und H. Herken: Biosynthese von 3-Acetylpyridin-adenindinucleotidphosphat (3-APADP) aus Nikotinamid-adenindinucleotidphosphat Arch. exp. Path. Pharmak. 245, 541 (1963)
17. Burchenal, J. H., E.A.D. Holmberg, H.F. Oettgen, S.C. Hemphill and J.A. Reppert: The effects of fluoronicotinamide against a spectrum of transplanted mouse leukemias. Fed.Proc. 18, 519 (1959)
18. Burton, R. M., R. A. Salvador, A. Goldin, and S.R. Humphreys: Interaction of nicotinamide with reserpine and chlorpromazine. Arch. int. Pharmacodyn. 128, 253 (1960)
19. Ciotti, M.M., N.O. Kaplan, A. Goldin and J.M. Venditti: Mechanism of the antileukemic and antinicotinic amide action of thiadiazoles. Proc. Amer. Ass. Cancer Res. 2, 287 (1958)
20. Cohn, W.E.: The anion exchange separation of ribonucleotides. J. Amer. Chem. Soc. 72, 1471 (1950)
21. Cohn, W.E. and C.E. Carter: The separation of adenosine polyphosphates by ion exchange and paperchromatography. J.Amer.Chem.Soc. 72, 4273 (1950)
22. Colowick, S.P., N.O. Kaplan and M.M. Ciotti: The reaction of pyridine nucleotide with cyanide and its analytical use. J.Biol.Chem. 191, 447 (1951)
23. Coper, H., I. Helge und H. Herken: Über die wirkung des Hexachlorcyclohexans auf die DPN- und TPN-Nucleosidase des Gehirns. Arch. exp. Path. Pharmak. 243, 99-112 (1962)
24. Coper, H. und A. Schabarek: Enzymatischer Austausch von 5- Fluornikotinamid gegen Nikotinamid in Pyridinnucleotiden. Naturwissenschaften. 53, 225 (1966)
25. Coper, H. und D. Neubert: Reaktionsgeschwindigkeit NAD(P)-abhängiger Oxydoreduktasen aus Rattengehirn mit 3-APAD. J. Neurochem. 10, 513 (1963)

26. Coper, H. und D. Neubert: Einflüsse von NADP-Analogen auf die Reaktionsgeschwindigkeit einiger NADP-bedürftiger Oxydoreduktasen. Biochem. Biophys. Acta. 89, 23 (1964)
27. Coper, H. und H. Herken: Pharmakologische Analyse der 3-Acetylpyridin-Vergiftung. Arch. exp. Path. Pharma 247, 291 (1962)
28. Dickermann, H.W., A. San Pietro and N.O. Kaplan: Pigspleen-pyridine transglykosidase. Biochem. Biophys. Acta. 62, 330 (1962)
29. Dietrich, L.S., L.A. Kaplan and J.M. Friedland: Pyridine nucleotide metabolism. Mechanism of action of the niacin antagonist 6-aminonicotinamide. J. Biol. Chem. 233, 964 (1958)
30. Fischer, M.: Untersuchungen über die Spezifität von Nucleosidase Enzymen. Inaugural-Diss. Math. nat. Fakultät der FU Berlin. (1964)
31. Holzer, H., B. Busch und H. Kröger: Enzymatisch-optische Bestimmung von TPNH und TPN neben DPNH und DPN. Z. physiol. Chem. 313, 184 (1958)
32. Holzer, M. und H. Kröger: Zum carcinostatistischen Wirkungsmechanismus von Äthylenimin-verbindungen. Biochem. Z. 330, 579-590 (1958)
33. Hurlbert, R.B., H. Schmitz, A.F. Brumm and V.R. Potter: "Nucleotide metabolism" Chromatographic separation of acid-soluble nucleotides. J. Biol. Chem. 209, 23 (1954)
34. Johnson, W.J. and J.D. McColl: Antimetabolite activity of 6-aminonicotinamide. Fed. Proc. 15, 284 (1956)
35. Kaplan, N.O. and M.M. Ciotti: The 3-Acetylpyridine analogue of DPN. J. Amer. Chem. Soc. 76, 1713 (1954)
36. Kaplan, N.O. and M.M. Ciotti: Chemistry and properties of the 3-Acetylpyridine analogue of diphosphopyridine nucleotide. J. Biol. Chem. 221, 823 (1956)
37. Kaplan, N.O., M.M. Ciotti and F.E. Stolzenbach: Studies on the Interaction of Diphosphopyridine nucleotide Analogues with Dehydrogenases. Arch. Biochem. Biophys. 69, 441 (1957)
38. Kaplan, N.O.: The neurochemistry of nucleotides and amino acids. Brady and tower. Seite 75 (1959)
39. Kaplan, N.O., A. Goldin, St. R. Humphreys, M.M. Ciotti and M. Venditti: Significance of enzymatically catalyzed exchange reactions in Chemotherapy. Science, 120, 437 (1954)

0. Koransky, W.: Trennung und Bestimmung der Nucleotide des Gehirns. Arch.exp.Path.Pharmak. 234,46 (1958)
1. Lamborg, M., F.E. Stolzenbach and N.O. Kaplan: The nicotinic acid analogue of diphosphopyridine nucleotide. J.Biol.Chem. 231,685 (1958)
2. Mejbbaum, W.: Über die Bestimmung kleiner Pentosemengen insbesondere in Derivat~~en~~ der Adenylsäure. Z.physiol. Chem. 258, 117 (1939)
3. Lipkin, D. and J. Dixon: Spectrophotometric determination of vicinal glycols- application to the determination of ribofuranosides. Analyt. Chem. 26,1092 (1954)
4. Mann, P.J.G. and J.H. Quastel: Nicotinamide, cozymase and tissue metabolism. Biochem. J. 35,502 (1941)
5. Mason, B.S.F.: J.Chem. Soc. (London) 5010 (1957), 674 (1958)
6. Markham, R. and J.D. Smith: Chromatographic studies of nucleic acids.Biochem. J. 45,294 (1949)
7. Kaplan, N.O., M.M.Ciotti and F.E. Stolzenbach: Reaction of pyridine nucleotide analogues with dehydrogenases, J.Biol.Chem. 221,833 (1955)
8. Neubert, D. und H. Coper: Die Geschwindigkeit der "malic enzyme" Reaktion in Gegenwart von NADP-Analogen. Biochem.Z. 341, 485 (1965)
9. Pullmann, M.E., A. San Pietro and S.P. Colowick: On the structure of reduced DPN. J. Biol.Chem.206,129 (1954)
0. Powell, R.D.: The chemotherapy of malaria. Clin.Pharmacol. Therap. 2,48 (1966)
1. Roesch, E., A. Roesch und D. Hoffter: Polyneuropathie durch 5-Nitro-8-hydroxychinolin in Tierexperimenten. Arch. Toxicol. 20,313-322(1965)
2. Schwartz, H.S., S.S. Sternberg and F.S. Phillips: Pharmacologic studies with 5-fluoronicotinamide. Unveröffentliche Versuche (1960)
3. Streighthoff, F.: Inhibition of bacteria by 5-fluoronicotinic acid and other analogues of nicotinic acid. J. Bacteriol. 85,42 (1963)
4. Threlfall, C.J.: Synthesis of diphosphopyridinenucleotide from nicotinamide by slices of liver. Nature, 184,60 (1959)

55. Uhlmann, F.: Eine neue campherähnlich wirkende Substanz.
Z.f.ges.exp.Med. 43, 556 (1924)
56. Walter, P. and N.O. Kaplan: Substituted Nicotinamid Analogues of Nicotinamide Adenin Dinucleotide.
J.Biol. Chem. 238, 2823 (1963)
57. Warburg, O. und W. Christian: Pyridin, der wasserstoffübertragende Bestandteil von Gärungsfermenten.
Biochem. Z. 287, 291 (1936)
58. Woolley, D.W.: Production of Nicotinic Acid Deficiency with 3-Acetylpyridine, the Ketone Analogue of Nicotinic Acid. J. Biol.Chem. 157, 445 (1945)
59. Zatman, L.J., N.O. Kaplan and S.P. Colowick: Inhibition of spleen diphosphopyridine nucleosidase by nicotinamide, an exchange reaction.
J. Biol.Chem. 200, 197 (1953)
60. Zatman, L.J., N.O. Kaplan, S.P. Colowick and M.M. Ciotti: The isolation and properties of the isonicotinic acid hydrazide analogue of diphosphopyridine nucleotide.
J.Biol.Chem. 209, 467 (1954)
61. Zenzo Tamura, Kozo Nagano, Hirokazu Tsukahara and Hisahi Kinoshita. Chem. Abstracts .
59, 14867 (1963)
62. Staab, H.A. : Einführung in die theoretische organische Chemie. Verlag Chemie, S. 644 (1959)

Abkürzungen

Ad = Adenin

AMP = Adenosin-mono-phosphat

ARPPR = Adenosin-5-diphosphat-ribose

5-Aminochinolin-ADP = 5-Aminochinolin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat

8-Aminochinolin-ADP = 8-Aminochinolin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat

6-ANAD(P) = 6-Aminonikotinamid-Adenin-Dinucleotid-(Phosphat)

3-APAD = 3-Acetylpyridin-Adenindinucleotid

3-ADADP = 3-Acetylpyridin-Adenindinucleotidphosphat

Nikethamid-AD = Coramin-Adenin-Dinucleotid

Nikethamid-ADP = Coramin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat

5-FNA = 5-Fluornikotinamid

5-FNA-ADP = 5-Fluornikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat

INA = Isonikotinsäureamid

INA-ADP = Isonikotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat

NS = Nikotinsäure

NA = Nikotinsäureamid

NAD = (DPN) = Nikotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid

NADP = (TPN) = Nikotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat

Nikotin-ADP = Nikotin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat

Herrn Professor Dr. med. H. Herken danke ich für die Möglichkeit zur Anfertigung dieser Arbeit im Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin und für sein Interesse und seine Anregung, die zu dieser Arbeit führten.

Daneben gilt mein besonderer Dank Herrn Professor Dr. med. H. Coper für die verständnisvolle Anleitung und stete Bereitschaft bei der Überwindung theoretischer und praktischer Schwierigkeiten.

Lebenslauf

Am 17. August 1937 wurde ich als Sohn des Händlers Abdulkader Schabarek und seiner Ehefrau Natiga geb. Assil in Alep/Syrien geboren.

Ich besuchte dort 5 Jahre die Volksschule und anschliessend das amerikanische "Aleppo-college" für 5 Jahre und dann die Mamun-oberschule bis zur Reifeprüfung im Jahre 1958. Mit dem Abiturzeugnis Richtung Naturwissenschaften und Physik konnte ich die akademischen Studien im Jahre 1958/1959 an der Wiener Universität aufnehmen.

Am 9. März 1961 habe ich die Teilprüfung des I. pharmazeutischen Rigorosums, bestehend aus Physik, Botanik und Experimentalchemie, mit der Gesamtnote "gut" abgelegt. Im Jahre 1964 bestand ich das pharmazeutische Magister-Examen. Die Zeit nach dem Ende meines Studiums an der Wiener-Universität verwendete ich zur Anfertigung einer Dissertation am Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin.

